平成 24 年度　修士論文

腹膜透析排液由来細胞の細胞間結合および腹膜機能診断への応用

Intercellular Junction of Peritoneal Dialysis Effluent derived Cells and Application to Diagnosis of Peritoneal Integrity

三重大学大学院工学研究科　博士前期課程

分子素材工学専攻

原　拓也

目次

1. 緒言 ・・・・・ 1

1-1. 腹膜透析療法

1-1-1. 透析療法の現状

1-1-2. 持続携帯式腹膜透析(CAPD)と合併症

1-1-3. 腹膜透析排液

1-1-4. 腹膜機能評価法

1-1-5. 腹膜中皮細胞(HPMC)の形態変化

1-2. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)

1-2-1. 腹膜透析と EMT

1-2-2. EMT マーカー

1-2-3. EMT 誘導因子

1-2-4. 腹膜透析排液由来(PDE)-HPMC の分子マーカー

1-3. Mesenchymal-to-epithelial transition (MET)

1-3-1. MET

1-3-2. MET 誘導因子

1-4. 細胞極性および細胞間結合

1-4-1. 細胞極性

1-4-2. 細胞間結合

1-4-3. 膜間電気抵抗(TER)測定

1-4-4. 腹膜機能と細胞間結合

1-5. 本研究の臨床的意義

2. 目的 ・・・・・ 17

3. 方法 ・・・・・ 18

3-1. 細胞単離・培養方法および実験系の作成

3-1-1. PDE-HPMC の分離および培養

3-1-2. 間葉系幹細胞(MSC)の培養
3-1-3. PDE-HPMC の初期細胞接着率の算出
3-1-4. PDE-HPMC の継代培養における細胞面積変化

3-2. 膜間電気抵抗(TER)測定
3-2-1. Transwell への細胞播種
3-2-2. TER 測定
3-2-3. TGF-β1 添加による TER 測定

3-3. 免疫蛍光染色による PDE-HPMC の Cytokeratin-18、α-SMA タンパク発現測定

3-4. TGF-β1 および BMP-7 添加による Cytokeratin-18, E-cadherin, Snail mRNA の経時的測定
3-4-1. AGPC 法による mRNA の抽出と定量
3-4-2. mRNA の逆転写による cDNA の作製と PCR による Cytokeratin-18, E-cadherin, Snail cDNA の増幅
3-4-3. アガロースゲル電気泳動およびバンドの定量

3-5. 二次元電気泳動
3-5-1. 溶液調整
3-5-2. 等電点電気泳動(一次元目)
3-5-3. SDS-電気泳動(二次元目)
3-5-4. Flamingo による蛍光染色および画像解析方法

3-6. 統計処理

4. 結果 ・・・・・ 26

4-1. PDE-HPMC のキャラクタリゼーション
4-1-1. 初期細胞接着率および細胞形態変化
4-1-2. 細胞面積変化

4-2. TER 測定
4-2-1. PDE-HPMC の TER 測定値
4-2-2. TGF-β1 添加した際の形態変化および TER 測定値

4-3. 免疫蛍光染色(Cytokeratin-18, α-SMA)
4-3-1. Cytokeratin-18 タンパク陽性率
4-3-2. α-SMA タンパク陽性率
4-3-3. α-SMA と TER 測定値との関連性

4-4. PDE-HPMC の TGF-β1 および BMP-7 添加モデルによる Cytokeratin-18, E-cadherin, Snail mRNA の経時的変化
4-4-1. TGF-β1 添加による Cytokeratin-18 mRNA 発現
4-4-2. TGF-β1 添加による E-cadherin mRNA 発現
4-4-3. TGF-β1 添加による Snail mRNA 発現
4-4-4. Cytokeratin-18 と E-cadherin との関連性
4-4-5. BMP-7 添加による各 mRNA 発現の経時的変化

4-5. 二次元電気泳動
4-5-1. CTL vs. TGF-β1 添加との比較
4-5-2. TER 測定値　高い患者 vs.低い患者との比較

5. 考察 ・・・・・ 42

5-1. PDE-HPMC の細胞間結合

5-2. TGF-β1 が細胞間結合へ及ぼす影響

5-3. EMT 誘導させた PDE-HPMC における Cytokeratin-18, E-cadherin, Snail の変化

5-4. BMP-7 の MET 誘導因子としての妥当性

5-5. 二次元電気泳動によるタンパク質変化

5-6. 臨床的意義との関連性

6. 結論 ・・・・・ 58

7. 今後の展望 ····· 59

8. 参考文献 ····· 60

9. 謝辞 ····· 66

10. **Appendix** ····· 67

A-1. 細胞培養 **Protocol**
A-2. 細胞面積測定
A-3. 膜間電気抵抗**(TER)**測定
A-4. 免疫蛍光化学染色法
A-5. AGPC 法
A-6. RNA 定量
A-7. RT-PCR 法
A-8. 二次元電気泳動
A-9. 統計処理

B-1. 滅菌方法
B-2. Primer 表
B-3. RT-PCR Program
B-4. 本研究で使用した試薬について

C-1. 腹膜透析患者まとめ

1. 緒言

1-1. 腹膜透析療法

1-1-1. 透析療法の現状

近年、本邦において食の欧米化が進み、糖尿病性腎症から慢性腎不全に移行し、人工透析を導入する患者が急増していることが明らかとなっている(Fig.1-1)。日本透析医学会の報告によると、本邦の透析患者数は毎年 1 万人ずつ増加しており、現在では約 30 万人にも及び、世界でも類を見ない透析大国となった。その透析療法の原疾患として、1998 年までは慢性糸球体腎炎が 1 位であったが、食の欧米化により現在では糖尿病性腎症が 1 位となっている(Fig.1-2)。これらの疾患によって腎臓の機能が 10%以下となると慢性腎不全に陥り、薬物療法や食事療法などの保存的療法では治療が困難となるため、人工透析が必要となる。

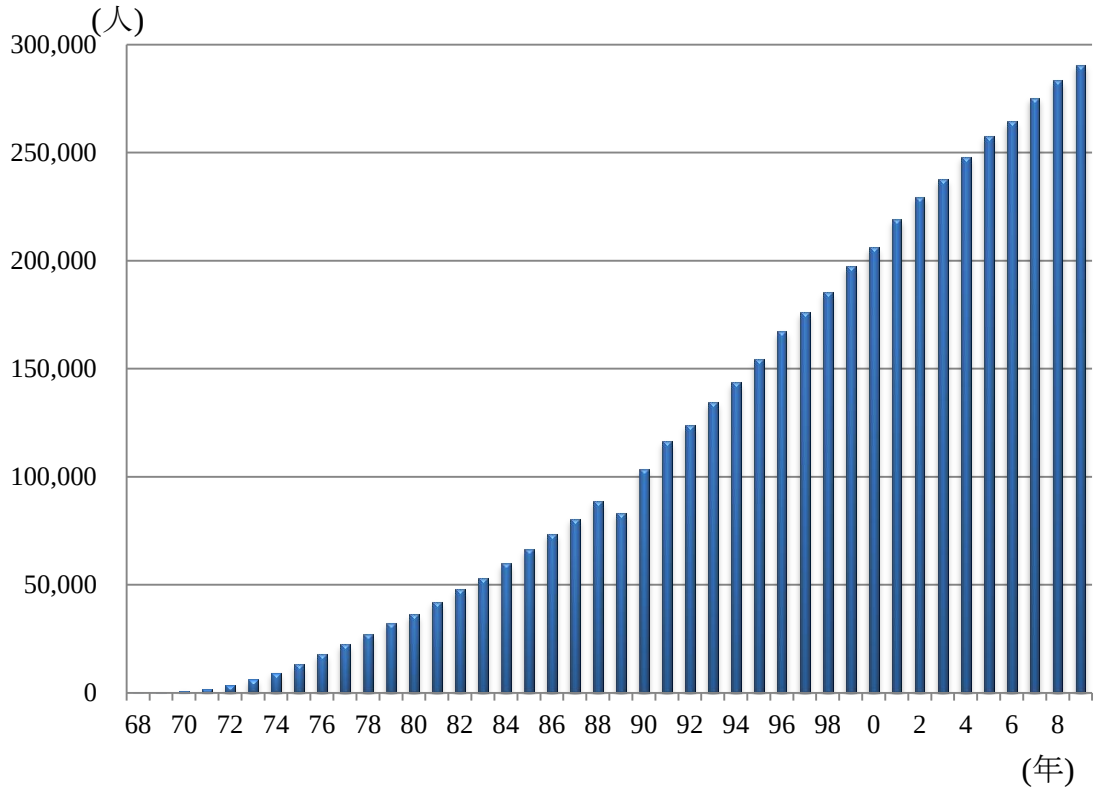


Fig.1-1 本邦における透析患者数の推移

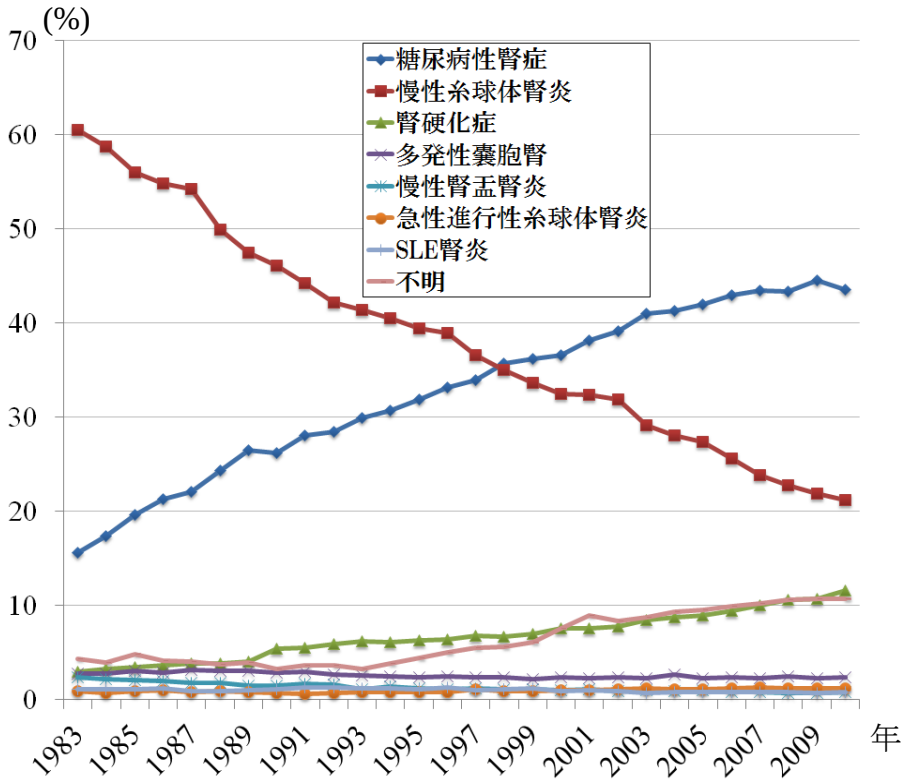


Fig.1-2 年別透析導入患者の主要原疾患の推移

この人工透析療法には血液透析(Hemodialysis; HD)と腹膜透析(Peritoneal Dialysis; PD)の 2 種類が存在している。HD は機械に血液を通して濾過するもので、PD は自分の生体膜を濾過装置として使用する方法である。本邦では、PD は併用療法を含めても 3.2%程度と非常に低い普及率にとどまっている(Fig.1-3)。腹膜透析には遜色ない利点があるということが国際的に認められているにもかかわらず、包括的腎代替療法の実践が著しく遅れているといえる。

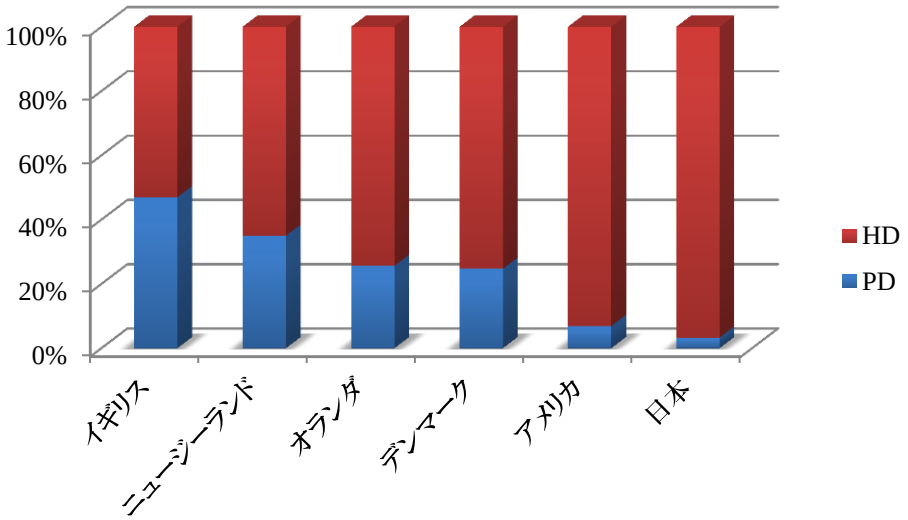


Fig.1-3 各国の血液透析(HD)と腹膜透析(PD)の割合

1-1-2. 持続携帯式腹膜透析(CAPD)と合併症

PD には、24 時間連続した透析で身体に負担の少ない連続携帯式腹膜透析(Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis; CAPD)と、機械を用いて夜間就寝中に自宅で自動的に透析を行う自動腹膜透析(Automated Peritoneal Dialysis; APD)の 2 種類存在するが、本邦では CAPD を行っている患者が殆どを占めている。

PD は、患者自身の腹腔内に高濃度 D-glucose を浸透圧勾配形成物質として用いた透析液を注入し、腹膜を介して拡散と限外濾過によって水・老廃物の除去、電解質、pH の調整を行う療法である(Fig.1-4)。腹膜は腹腔の内側を覆う壁側腹膜と、腹部臓器(腎臓、肝臓、膵臓、脾臓など)とその間膜(大網、胃、腸間膜)を覆う臓側腹膜からなる漿膜組織であり、たくさんの微絨毛を持つ一層の中皮細胞に覆われている(Fig.1-5)。PD は自己管理が中心の在宅治療であるため、月に 1~2 回の診察のみでよい。そのため、就学や就労がしやすいこと、残存腎機能の維持がし易いこと、必要な器材や薬液のコストが HD と比べて僅かであることなど、経済効果が大きいことなどの利点も多い治療法である。

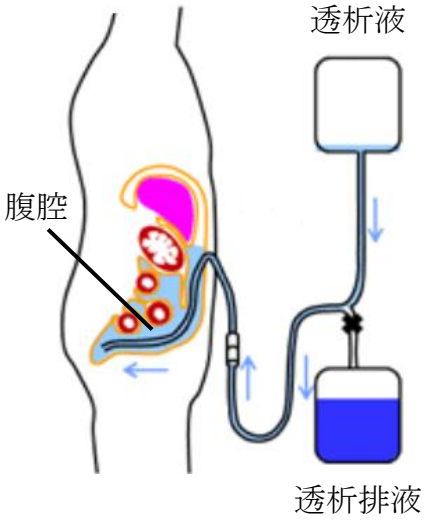


Fig.1-4 腹膜透析

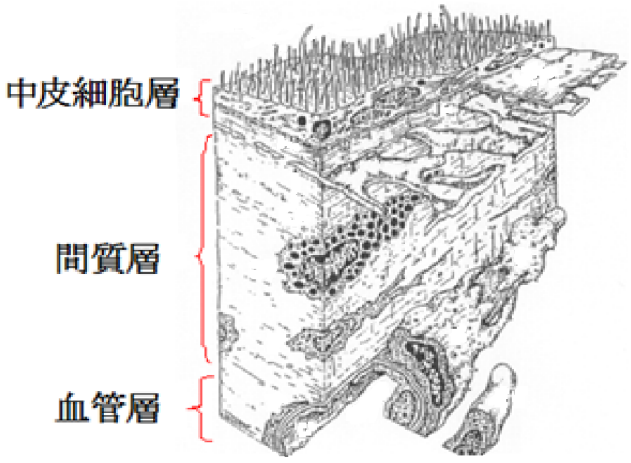


Fig.1-5 正常腹膜構造の形態学的模式図

しかしながら、透析液中の主成分である D-glucose や Glucose 分解産物(Glucose Degradation Products; GDPs)の影響により、溶質透過性亢進や除水不全、さらには腹膜線維症や腹膜線維症といった合併症を引き起こし、PD を継続出来ない症例が報告されている[1]。そのため腹膜透析患者の腹膜機能を維持し、長期間の治療を可能にすることが PD の大きな課題となっている。そこで腹膜機能の状態を評価できる無侵襲診断法の確立が必須となる。

1-1-3. 腹膜透析排液

PD は約 2L の透析液を腹腔内に貯留することで血液浄化を行う治療法であるが、透析効率を維持するため 1 日 3～4 回の透析液交換が必須である。その都度、腹膜透析排液が廃棄されている。この透析排液中には、腹膜透析により体内から排出された水や、尿素、Creatinine(Cr)のような老廃物、そして Na イオン、K イオン、Ca イオンといった電解質もバランスを調整され含まれている。細胞成分に関しては、白血球やマクロファージなどの血球系の細胞などに加え、腹膜を構成している腹膜中皮細胞(human peritoneal mesothelial cells; HPMC)が含まれているという報告がある(Fig.1-6)[2]。

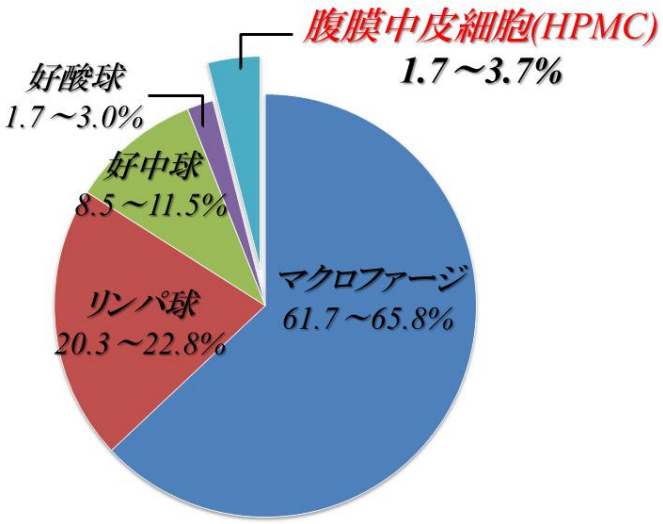


Fig.1-6 腹膜透析排液中に含まれる細胞群の内訳[2]

腹膜透析排液は 1 人の患者あたり 1 日 4 回の交換を行い、生じる排液の量は約 8L/day であり、1 年間では 3000L にも及ぶ。この腹膜透析排液から得られる情報は多く、腹膜状態を診断する無侵襲診断法として近年発展を遂げている。

1-1-4. 腹膜機能評価法

1-1-3 でも述べたが、腹膜透析排液から得られる情報はかなり多いことから、腹膜機能を評価することにも利用されている。腹膜透析療法において腹膜機能の評価は非常に重要であるが、一般的に尿毒素を取り除く効率および水分を取り除く効率という機能に着目して腹膜機能は評価されている。ここでは、既存の腹膜機能評価法について述べる。

<腹膜生検>

通常腹膜生検には、開腹あるいは腹腔鏡による腹膜生検、CT ガイド下腹膜生検がある。特に、前者の腹腔鏡による検査は確定診断に有用であるが、腹膜の癒着のために試験開腹が必要となる場合がある[3][4]。そこで、侵襲性のある開腹手術、腹腔鏡による生検を行う前にエコーガイド下の生検を考慮する方法も考えられている[5]。

<腹膜平衡試験(Peritoneal Equilibrium Test; PET)>

PET は血中(P)および透析排液中(D)の Cr を測定する試験法であり、1987 年に Twaswski らが提唱した試験法である。2.5%腹膜透析液 2L を用いて、停滞時間なしに注液および完全に排液を行い、新たに 2.5%腹膜透析液 2L を注入する。注液終了より正確に 4 時間貯液し、完全に排液を行う。検査中は空腹とし、注液終了時より 2 時間目に採血する。そこで Cr の D/P 比を算出し、さらに 0、4 時間目の透析液の糖濃度を測定し D/D0 glucose 濃度比を算出する。これらの D/P-Cr と D/D0-glucose 比によって Fig.1-7 のように H、HA、LA、L に分類して評価する。H は溶質透過性が亢進し、除水不全傾向にあり、L では逆の評価となる。H は腹膜硬化と関連しているが、1 回の PET 出来るものではない。なお、PET はある一点の値よりも、患者の継時的変化を追うことが重要である。PD 期間の増加と共に H の傾向が高まれば、腹膜機能が劣化してきたと判断されるものである[6]。

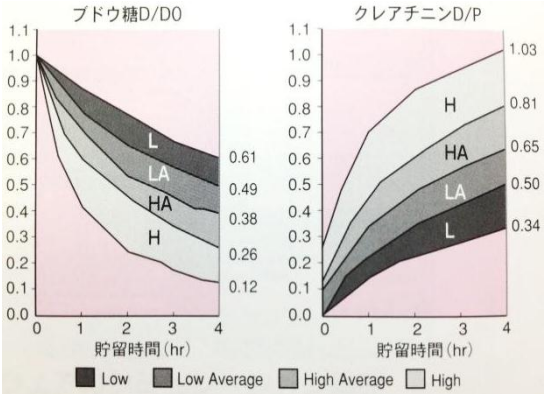


Fig.1-7 腹膜平衡試験[6]

<PD 期間および細胞面積による中皮細胞診>

腹膜表面より透析排液中に剥離した中皮細胞の面積測定を行い、中皮細胞の障害を推定する検査である。被嚢性腹膜硬化症(EPS)予防のための PD 停止の判断基準として、一般的に考慮されているのは PD 期間 8 年以上と PET でのカテゴリーH である。Fig.1-8 に EPS 状態(EPS もしくは腸閉塞)および前 EPS 状態(腹水貯留もしくは CRP 上昇)予防のためのアルゴリズムを作成したものである。これは PD 期間と中皮細胞診からの判断であり、PD の中止基準としてはほかの臨床所見なども考慮されるべきである[6]。

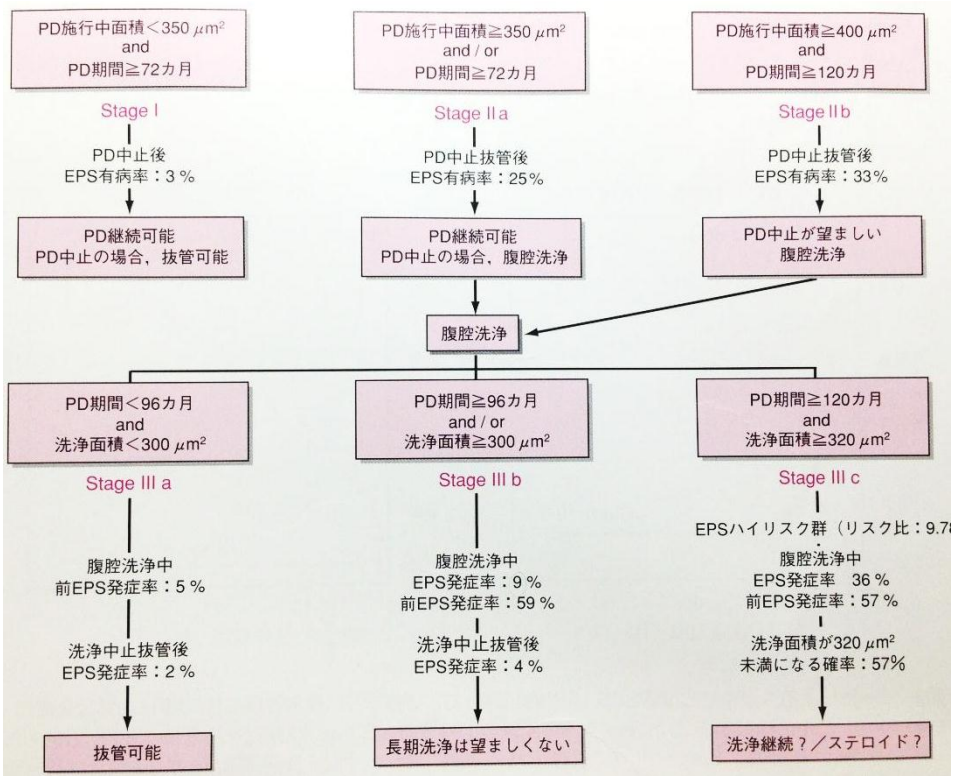


Fig.1-8 PD 症例における EPS およびその予防のためのアルゴリズム[6]

<MMP-9、MMP-2>

MMP-9(Matrix metalloproteinase)は種々細胞外タンパク質の分解酵素である。腹膜炎などの合併症では、好中球が MMP-9 を産生し、中皮細胞下の基底膜を分解し、腹腔から腹膜間質層へと浸潤していくため、透析排液中の MMP-9 濃度が上昇する。また、MMP-2 は腹膜マクロファージ、中皮細胞、筋繊維芽細胞および血管内皮細胞から分泌されることが知られており、透析排液中 MMP-2 増加により EPS の発症がみられたという報告あり[7]、今後 EPS 前段階の診断指標として有用である可能性が高い。

<IL-6>

IL-6(interleukin-6)は腹膜中皮細胞、繊維芽細胞および腹腔の好中球やマクロファージから産生され、急性腹膜炎時には透析排液中 IL-6 は一過性に上昇する。また、酸性透析液などによる慢性の腹膜障害において、腹膜の線維化と平行して継時的に上昇している。これらの結果から、透析排液中の IL-6 上昇は腹膜障害を表すパラメータとして考えられている[8]。

現在では上記に述べた様々な試験方法により透析患者の腹膜機能状態を評価している。しかし、現状では腹膜機能状態を確実に捉えることは未だ困難である。従って、腹膜透析患者にとって無侵襲かつ腹膜機能を正確に捉えることのできる新たな診断法が、今後必要であると考えられる。

1-1-5. 腹膜中皮細胞(HPMC)の形態変化

過去の報告によると、正常組織である大網由来腹膜中皮細胞(Omentum-derived HPMC; OM-HPMC)と、腹膜透析排液中の細胞(PDE-HPMC)との間に、タンパク質および mRNA の違いが生じることが分かっている[9]。さらに、PDE-HPMC には中皮細胞特有の玉石状を示している細胞と、障害を受け線維芽様細胞の形態を示している細胞が混在していることが示されている(Fig.1-9)。

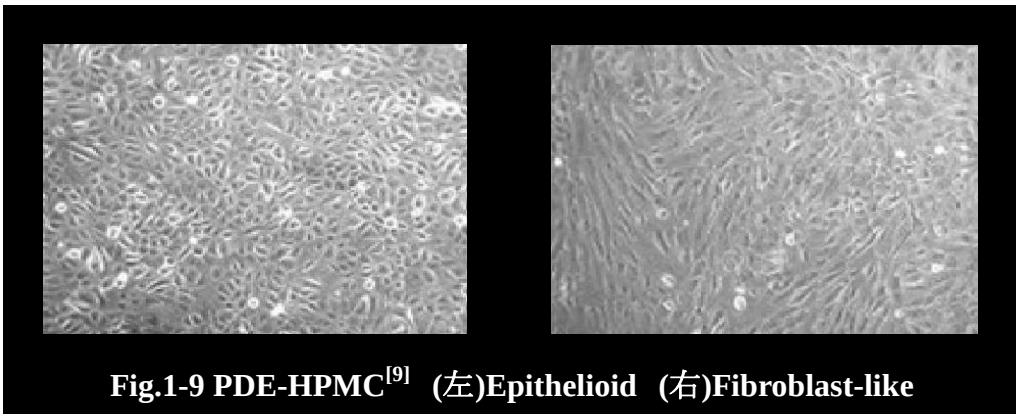


Fig.1-9 PDE-HPMC[9] (左)Epithelioid (右)Fibroblast-like

このように、腹膜透析排液中の細胞(PDE-HPMC)が様々な形態を成しているという報告からも、腹膜透析患者の PDE-HPMC 形態変化を追うことで、腹膜機能診断法への有用性が伺える。

1-2. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)

1-2-1. 腹膜透析と EMT

先に述べたとおり、腹膜透析を長期間行うことにより、腹膜炎や腹膜内出血が頻繁に引き起こされる危険性が高まり、さらには腹膜硬化症や腹膜線維症を引き起こすこともある。上記のような合併症による腹膜組織の機能・構造変化は、主に腹膜透析液の高浸透圧や酸性、加熱滅菌時に生じる GDPs (Glucose Degradation Products)の影響で、HPMC は剥離し遊走すると考えられている。この時 HPMC は上皮間葉形質変換(Epithelial-to-mesenchymal transition; EMT)を引き起こし、細胞間接着を失うことで上皮細胞極性を失い、遊走・浸潤能を得た細胞は、間質層へと浸潤していくと仮説が立てられている[10][11]。

EMT は、がんの転移や初期胚発生の原腸陥入などの器官形成に対して重要な役割を果たしている現象である。特に、種々の線維症に関わる現象であり、上皮系細胞が繊維芽様細胞へと形質変換することで細胞間結合の減少を引き起こし、それに伴い上皮としての細胞極性を失うことが知られている(Fig.1-10)[12][13]。

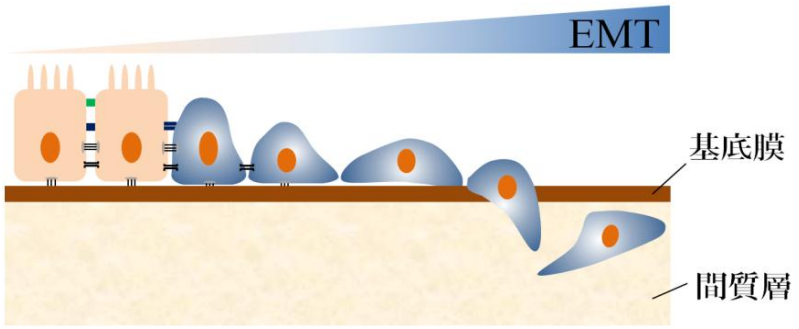


Fig.1-10 EMT による細胞遊走・浸潤

1-2-2. EMT マーカー

上皮系細胞が間葉系細胞に形質変化するとき、構造的・機能的に変化するため、様々な分子を再構成する必要がある。上皮細胞で保持していた mRNA やタンパク質が減少し、間葉系細胞がもつ特有の mRNA やタンパク質を発現していく。ここでは EMT が生じた際に、どのような mRNA やタンパク質が増減を示すのか示した(Table.1-1)。

Table.1-1 代表的な EMT マーカー[12][14-17][19-21]

EMT マーカー		機能
up-regulate	Snail	細胞間結合分子の減少に関与する転写因子の 1 つ。
	α-SMA	細胞骨格を形成するタンパク質。
	Fibronectin	細胞接着や遊走に関与する細胞外マトリックス。
	Collagen Ⅰ	間質の主な構成成分である細胞外マトリックス。
	Vimentin	間葉系細胞の中間径フィラメントを形成している。
	MMP-2/9	主に Collagen Ⅳを分解する酵素。
down-regulate	E-cadherin	細胞間結合(Adherence Junction)を構成するタンパク質。
	Cytokeratin	上皮細胞の中間径フィラメント構成成分。
	Occludins	細胞間結合(Tight Junction)を構成するタンパク質の 1 つ。
	ZO-1	Occludins の裏打ちタンパク質。

E-cadherin や Occludins、ZO-1 などは細胞間結合に関与するタンパク質であり[16][17]、EMT を起こしたときに細胞間結合が解離してしまうために減少する[16]。特に、E-cadherin に関しては、エンドサイトーシスなどによる細胞間結合現象メカニズムが明らかとなりつつあるが、その詳細は未だ不明瞭である[18]。Snail は遺伝子レベルで細胞間結合を制御する転写因子として知られ[11]、α-SMA(α-smooth muscle actin)細胞骨格を形成するタンパク質で、形質変化に伴い発現する[19]。FN や Collagen は間葉系細胞が産生する主な細胞外マトリックスで、形質変化することで産生するようになる。MMP-2/9(matrix metalloproteinase-2/9)は、細胞外マトリックス分解酵素で主に基底膜を破壊し、間質へと遊走を始める[20]。Cytokeratin は上皮細胞のマーカー、Vimentin は間葉系細胞に特有の中間径フィラメントの構成成分であり、上皮細胞の極性を失い、間葉系の特性を得るためにそれぞれ変化する[21]。これらの分子マーカーを測定することにより、EMT が生じたかどうかの判別を付けることが可能である。

1-2-3. EMT 誘導因子

EMT は、多くの growth factor やサイトカイン、ホルモンなどの細胞外物質によって制御されている。現在では、EMT を誘導する物質として様々なサイトカインやタンパク質の存在が知られている。ここでは現在報告されている EMT 誘導因子を示した(Table.1-2)。

Table.1-2 EMT 誘導因子

分子	特徴・機能
TGF-β1 (transforming growth factor-β1)	透析液中の D-glucose の影響により、中皮細胞がオートクリン作用で産生し、その影響により EMT を引き起こすとされている。[11][12][15]
EGF (epidermal growth factor)	血小板から分泌され、細胞の増殖や遊走、細胞外マトリックス産生などの機能を持ち、血管新生時に発現し、EMT 誘導することが知られている。[15]
AGEs (advanced glycation end products)	糖からメイラード反応を経て形成される物質。尿細管繊維症の亢進を担っており、EMT に大きく関係していると考えられている。[22][23]
IL-1 (interleukin-1)	リンパ球の分化・増殖を促進する因子として同定されており、炎症が起きると単球やマクロファージなどから産生され、血管内皮への付着、および血管内膜への侵入を促進すると知られている。[24][25]
HGF (hepatocyte growth factor)	細胞分散因子とも呼ばれ、上皮細胞の分散作用や運動性促進作用を持っている。初期発生における EMT 作用を媒介する物質として考えられている。[24][26]
TNF-α (tumor necrosis factor-α)	E-cadherin を抑制し、Vimentin 発現を促進して MMP-9 を活性化させることで EMT を引き起こす。[27]

組織においては、これらの様々な因子が相互作用して EMT を進行させることが知られている。その中でも TGF-β1 は、様々な病理状態において EMT を誘導し、間質線維症を導く因子として特定されており、EMT を誘導する因子としては最も研究が進んで行われている。腹膜組織においても炎症時には過剰に産生することが報告されている[28][29]。

1-2-4. 腹膜透析排液由来(PDE)-HPMC の分子マーカー

本研究と関連のある過去の研究から、正常組織である大網由来腹膜中皮細胞(Omentum-derived HPMC; OM-HPMC)と、排液中に混在する細胞の分子マーカーに違いが生じることが知られている(Table.1-3)[9][21]。

Table.1-3 腹膜中皮細胞(HPMC)の分子マーカーの変化[9][21]

分子マーカー	Omentum	Peritoneal dialysis effluent-derived		Fibroblast
		Epithelioid	Fibroblast-like	
E-cadherin	+++	+	-	-
Snail(mRNA)	-	+/-	+++	+++
ICAM-1	+++	+++	+++	-
Cytokeratins	+++	++	+/-	-
Vimentin	+	++	+++	+++
VEGF	+	++	+++	-
CA125	+++	+++	+++	-
Fibronectin	+/-	+	+++	+++
Collagen Ⅰ	+/-	+	+++	+++
α-SMA	+	+/-	++	++
CTGF	+	+	ND	+++
TGF-β	+	+	ND	++
N-cadherin	-	+	++	++
CD34	-	-	-	+++

ICAM-1=intercellular adhesion molecule-1; CA125=cancer antigen 125; VEGF=vascular endothelial growth factor; α-SMA=α-smooth muscle actin; CTGF=connective tissue growth factor; TGF-β=transforming forming growth factor β; ND=not determined

E-cadherin などを見ると、OM-HPMC では+++であるのに対し、PDE-HPMC (Fibroblast-like)ではーであり、発現量に大きな違いが生じていることが明らかとなっている。このように、腹膜から脱離した PDE-HPMC には、Epithelioid の細胞と、Fibroblast-like の細胞が存在し、その両者の間でタンパク質や mRNA に大きな違いが生じていることが明らかとなっており、これを利用した腹膜機能診断への応用が期待されている。

1-3. Mesenchymal-to-epithelial transition (MET)

1-3-1. MET

先述したように、TGF-β1 などの影響によって上皮系の細胞が間葉系の細胞へと脱分化する現象のことを EMT と言うが、これに対して間葉系の細胞が上皮系の細胞へと分化する、Mesenchymal-to-epithelial transition (MET)という現象がある。MET は、組織形成の過程において誘導されたり、癌細胞が転移後にその場に住み着くために誘導されたりするため、EMT 同様に必要な時には誘導し、生体に害を与える際には防がなければならない現象である。これを利用して腹膜透析時の線維化の進行を遅らそうとする研究が近年増加傾向にある[30][31]。

1-3-2. MET 誘導因子

詳細なメカニズムに関しては、未だ不明な部分が多いが、現在報告されている MET 誘導因子を Table1-4 に示す。

Table.1-4 MET 誘導因子

分子	特徴・機能
BMP-7 (Bone morphogenetic protein-7)	尿細管修復作用として作用するとされており、EMT が生じた際、細胞間結合関連タンパク質である E-cadherin の発現向上作用を持つと考えられている。
HGF (Hepatocyte growth factor)	細胞分散因子であるが、細胞間結合に良い影響を及ぼし、MET を促進するという報告がある。
L-Cys (L-cysteine)	抗酸化作用を持つ糖アルコールである。
Mannitol	糖アルコールの一種であり、ZO-1 や E-cadherin の発現向上作用を持つ。

BMP-7 と HGF に関しては、比較的以前から MET 誘導因子として考えられてきた[31][32][33]。これらの役割についてはまだ不明な点が多いが、MET 誘導因子としての報告が数多く存在することから、EMT-MET の研究を行うに当たって非常に興味深いサイトカインの一つであると言える。L-Cys は、ジスルフィド結合を介したタンパク質の立体構造の維持、SH 基の酸化還元反応による生体成分の代謝などの生理的に重要なアミノ酸であり、細胞への抗酸化能を持っている[34][35]。この L-Cys が細胞へ取り込まれることで、細胞の老化を防ぎ、細胞形態維持へと繋がるという報告がある。また、糖アルコールの一種である Mannitol は、一般的に浸透圧調整剤や利尿剤として使用されているが、細胞に添加することで、E-cadherin やその裏打ちタンパク質である β-catenin などの発現を高める作用を持っている[36]。

1-4. 細胞極性および細胞間結合

1-4-1. 細胞極性

細胞極性は、細胞が持つ形態、分裂、細胞間相互作用を非対称化し、細胞の空間的な制御において重要な役割を担っており、生物の発生や細胞の機能発現には欠かせない特質である。特に上皮(中皮)細胞や神経細胞においては厳密な極性を保持しており、細胞が正常に働くために必須の性質である。

細胞極性の形成機構については未だ明瞭ではないが、まず細胞接着により細胞膜上に位置シグナルが形成されることが提案されている。その後、その位置のシグナルに応じてアクチンフィラメントや微小管等の細胞骨格分子が、様々なタンパク質を正しい位置へと輸送している。この細胞接着には、特に細胞間結合(Tight Junction; TJ, Adherence Junction; AJ)が重要な役割を果たしていると考えられている[37]。

1-4-2. 細胞間結合

細胞間結合に関与する細胞接着装置は、先述したTJやAJに加え、Desmosome (DS)、Gap Junction(GJ)の4種類が存在している(Fig.1-11)。これらの細胞間接着が消失して極性が失われると、細胞は様々な影響を受ける。

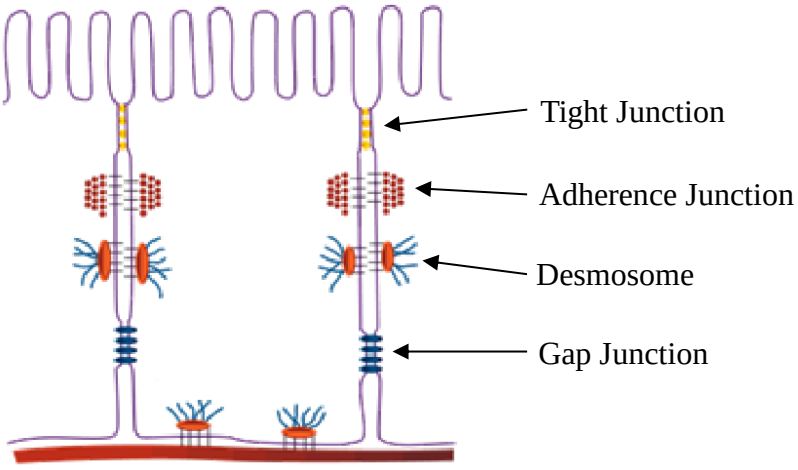


Fig.1-11 細胞間結合

細胞極性に関与すると考えられているTJは、その名称通り水分も貫通出来ないほど細胞間を接着させている(Fig.1-12)[37]。TJ タンパク質はジッパーのように隣り合った細胞の細胞膜を連続的につなげ合わせる役割を果たしており、主要な膜貫通

タンパク質は Claudin や Occludin から成っている。これにより、細胞間隙と細胞の自由表面は不連続になる。この TJ のために、上皮細胞のシートは外側と内側を分けるバリヤーとなり、溶質は自由に組織の内側に入ることができない。また、TJ は膜タンパク質の自由な拡散を妨げるので、TJ で分けられた 2 つの細胞膜の区画の膜タンパク質は交じり合うことができなくなる。

AJ は TJ のすぐ下に連続した接着帯を作り、連結した細胞を囲んでいることが多い。隣り合う細胞の接着帯は並んでおり、細胞膜同士は膜貫通タンパクの cadherin で結ばれている。細胞内では、収縮性のアクチンフィラメントの束が、接着帯に隣接して細胞膜と並行して存在している。このフィラメントの束は、カテニンやビンキュリンなどの細胞内アンカータンパク群を介して細胞膜に連結している。このようにして actin は cadherin とアンカータンパクを介して互いに連結し合い、細胞をつなぎ合う網目構造を作っている[38]。これが細胞の形態形成に関与していると考えられている。

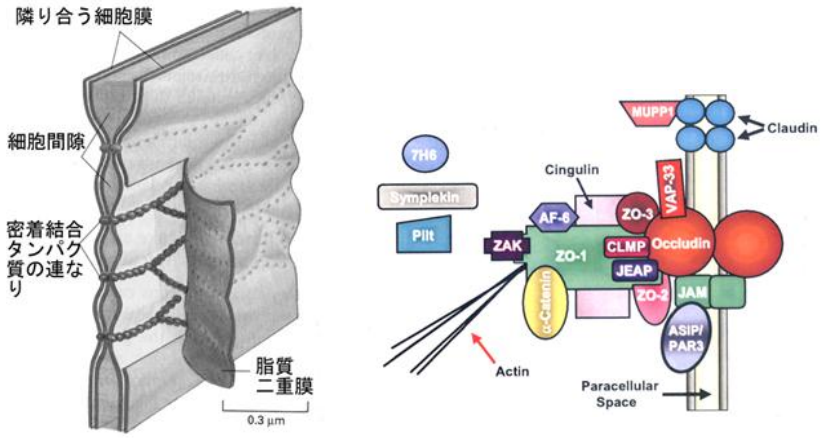


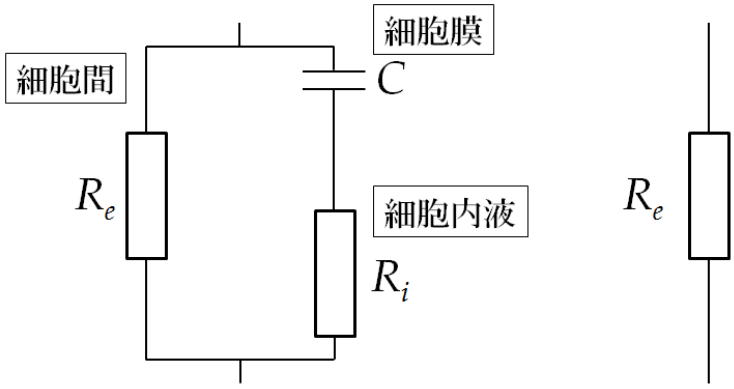
Fig.1-12 Tight Junction[37]

1-4-3. 膜間電気抵抗(TER)測定

細胞間結合形成能の変化を電気的に測定する方法として、膜間電気抵抗(trans-electrical resistance; TER)測定がある。これは Polyester フィルター上で培養した細胞に微弱な電流を流し、電位差を生じさせることで抵抗値を算出し、その抵抗値の変化で細胞増殖や、それに伴う細胞間結合の形成などを評価する測定法である。TER 測定は細胞層を介して設置された電極間に交流矩形波電流を流すことで、培地中の電子の移動方向が変化し、それに準じて培地中の陽イオン(主に Na^+)の移動によって生じる電位変化を測定している。

ここで細胞内液、細胞外液、細胞膜についてコンデンサー成分(C)と抵抗成分(R_e :細胞外液抵抗, R_i :細胞内液抵抗)の並列回路と考えることで、細胞の電気的等価回路ができる(Fig.1-13(A))。細胞膜を受動的電気特性の面から眺めると、抵抗

率の非常に高い(誘電率が 0 に近い)絶縁物と類似した物質であり、厚さが極めて薄いため、大きな電気容量を示す。しかし、12.5Hz という低周波では誘電率が高く、導電率が低いことから、細胞の電気等価回路では細胞膜−細胞内への電流の流れを阻止し、細胞外液つまり細胞間隙のみに電流が流れる(Fig.1-13(B))。



(A)細胞の電気的等価回路　　(B)低周波での等価回路

Fig.1-13 細胞電気的等価回路

よって低周波領域での TER 測定から得られる抵抗値は、細胞間隙の構造を反映するものと考えられる。従って、その流路を構成する接着タンパクの密集性や結合性、種類により抵抗値は変化する [39]。特に TER 測定においては Tight Junction が主に関与していると言われている。

1-4-4. 腹膜機能と細胞間結合

PDE-HPMC には玉石状の HPMC (Epithelioid PDE-HPMC)の他に、EMT が生じて紡錘状へと形質変化した HPMC (Fibroblast-like PDE-HPMC)の混在が示唆されている[9][21]。そして、細胞の形態変化と細胞間結合との間には強い関連性があり、EMT が生じると形態変化を起こすだけでなく、細胞間結合タンパク質の発現が減少するなど細胞自身が持つ機能にも変化を及ぼす。このことから、透析排液から採取した細胞中の細胞間結合状態を把握することが、腹膜透析患者の腹膜機能診断へと直接結びつく有用なツールとなる可能性が高い。

1-5. 本研究の臨床的意義

1-1-4 で述べた既存の腹膜機能診断法は、PD 継続中止基準として用いられており、腹膜線維症などの合併症を防ぐ上で必須であるため、今後も発展していくことが期待されている。本研究は、腹膜透析患者から採取した PDE-HPMC の細胞間結合などの機能特性を捉えることで、そのキャラクタリゼーションを行うと共に、各々の透析患者で PDE-HPMC の細胞機能特性が異なるかを臨床データと絡めて試験したものである。本研究を通じ、既存の無侵襲腹膜診断法に加え、臨床的細胞機能評価を加えることで、より一層信憑性の高い腹膜機能診断法の確立が期待される。

2. 目的

腹膜透析を行った際に生じる透析排液中には、多くの血球系細胞が含まれているが、その中に腹膜を構成している腹膜中皮細胞(human peritoneal mesothelial cells; HPMC)が存在していることが知られている。本研究では、この排液中に存在する腹膜透析排液由来腹膜中皮細胞(peritoneal dialysis effluent derived-HPMC; PDE-HPMC)が腹膜透析患者の腹膜温存状態を反映するものと仮説を立て、脱離した PDE-HPMC の細胞間結合の観点からキャラクタリゼーションおよび細胞機能評価を行い、腹膜透析患者の腹膜状態を診断する無侵襲腹膜機能診断法の確立へ繋げることを目的とする。

3. 方法

今回本研究で用いた実験試薬ならびに機器に関する詳細なデータは10.Appendix に記載した。

3-1. 細胞単離・培養方法および実験系の作成

3-1-1. PDE-HPMC の分離および培養

三重大学医学部付属病院にて治療中の腹膜透析患者 14 名(男性 12 名、女性 2 名)の透析排液を用いて本研究を行った。年齢は平均 71.56 (50-84)歳で透析期間の平均は 29.64 (1-71)ヶ月であり(Table.3-1)、本研究期間に使用した透析液は Dianeal N-PD2 1.5、Dianeal N-PD2 2.5、Extraneal (Baxter 社)の 3 種であった。透析排液に 1M EDTA /生理食塩水溶液を最終濃度 2.5mM になるよう添加し、50G で 10 分間遠心分離することで細胞を採取した。詳しい細胞単離方法については Appendix A-1.に記載した。

Table.3-1 腹膜透析患者の情報

＊他界

Patients ID	A	B	C*	E*	H	N	O	Q	R	S	T	U	V	W
Sex	M	M	M	M	M	M	F	F	M	M	M	M	M	M
Age	83	78	69	62	83	50	68	68	71	75	71	41	73	59
CAPD duration (month)	39-71	11-41	24-27	4	2-16	37-50	20	1-2	1-5	36	1	1-3	1	12
Dialysate	①②③	①③	①③	①②③	①③	①③	①③	①	①③	②	①	①	①	①
Amount of dialysate	1500, 2000	1500, 2000	1500	1500	1500	1500, 2500	1500	1000	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Number of PDE collected	22	24	4	3	5	13	2	4	8	1	2	3	1	1

透析液の種類

① Baxter Dianeal N PD-2 1.5 ② Baxter Dianeal N PD-2 1.5 ③Baxter Extraneal

また、透析排液から採取した PDE-HPMC は、10%FBS/M199 培地を用いて懸濁液を作成した後、φ35 シャーレ等に播種した。培地交換は 3 日に 1 回行い、基本的に本実験系では Passage 1 と Passage 2 の細胞を用いて実験を行っている。

3-1-2. 間葉系幹細胞(MSC)の培養

本研究で使用した間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells; MSC)は、理化学研究所バイオリソースセンターから購入したMSCを用いた。5000cells/cm^{2}で細胞を播種し、培地に3ng/mL bFGFを添加した10%FBS/DMEMを用いてφ35シャーレで培養した。培地は3日に1回交換した。

3-1-3. PDE-HPMCの初期細胞接着率の算出

3-1-3-1. 静止画撮影

腹膜透析排液から細胞を抽出した後、または継代作業によって細胞を播種した後、ほぼ毎日位相差顕微鏡CK2にて観察し、デジタルカメラによりφ35シャーレまたは25cm^{2}フラスコをランダムに各4ヶ所撮影し、その画像をパソコンに取り込んだ(Fig.3-1)。

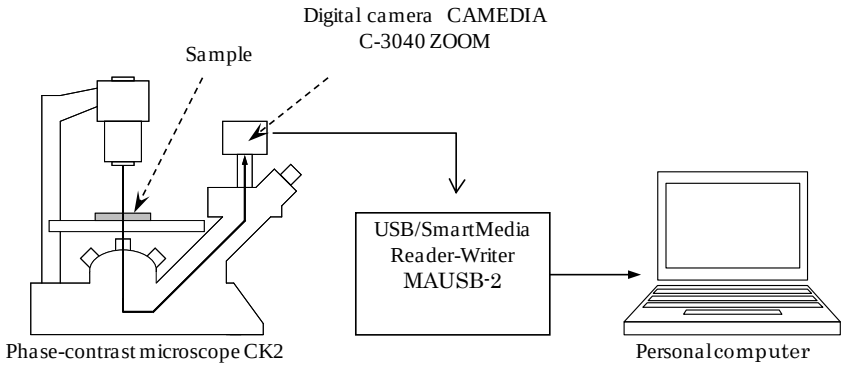


Fig.3-1. 画像取り込みダイアグラム

3-1-3-2. 細胞カウント

無作為に撮影した位相差顕微鏡の写真をパソコンソフト"KC"を用いて細胞を数えた。細胞の核を目安にカウントを行い、同じサンプルにつき4枚の写真があるので、それらの平均をとりサンプルの写真1枚当たりの細胞数の平均値を算出した。

3-1-3-3. 細胞接着率の算出

平均した細胞数を817.3倍※することで、φ35シャーレ1枚当たりの細胞数を算出した。その1枚当たりの細胞数を播種した細胞数で割り、割合を求める。式は以下の通りである。

$$\text{接着細胞率}(\%) = \frac{\varphi 35\ シャーレ or 25cm^2\ フラスコ\ 1\ 枚当たりの細胞数}{播種細胞数} \times 100$$

※φ35シャーレの面積は9.6cm^{2}である為、これをデジタルカメラの写真1枚当たりの面積(0.0117cm^2)で割ることから817.3倍を算出した(Fig.3-2)。

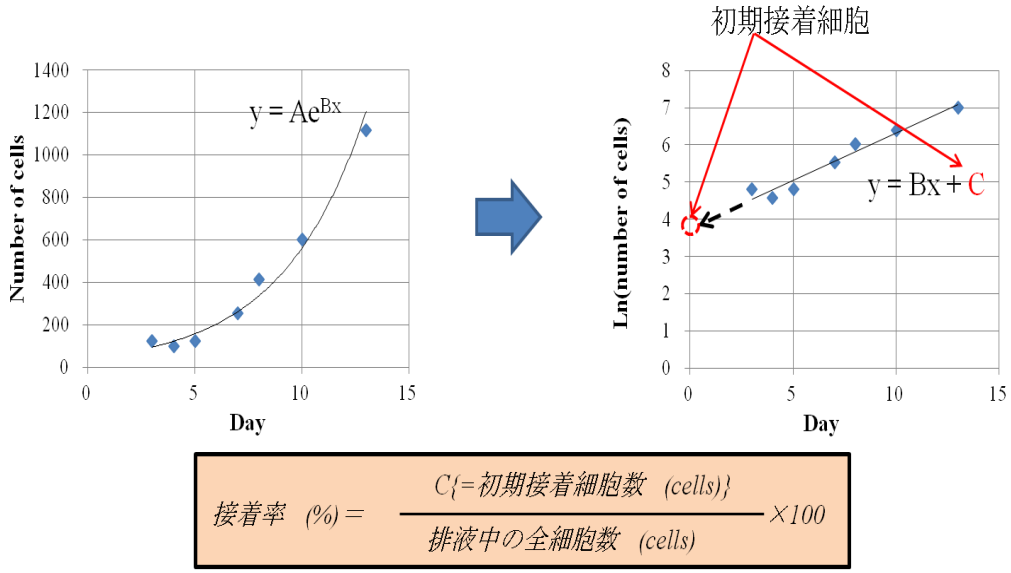


Fig.3-2 細胞接着率の算出方法

3-1-4. PDE-HPMC の継代培養における細胞面積変化

φ35 シャーレ上で PDE-HPMC をコンフルエントまで培養した後、位相差顕微鏡上で細胞形態を写真撮影した。その後、ランダムに細胞を 50 個選択し、解析ソフト Image J を用いて細胞面積を算出した。詳細については Appendix A-6 にて記載する。

3-2. 膜間電気抵抗(TER)測定

3-2-1. Transwell への細胞播種

PDE-HPMC と MSC をサブコンフルエントになるまで培養し、継代作業時の細胞懸濁液(細胞密度 1×10^5cells/cm^2)を、ポリエステルフィルター(孔径 0.4μm、培養面積 1cm^2、Transwell、12well-Type、Costar、MA、USA)上に播種し、10%FBS/M199 培地、または 3ng/mL bFGF を加えた 10%FBS/DMEM 培地で培養した。apical 側には 0.5mL、basal 側には 1.5mL の培地を加え、週 2 回培地交換を行った。

3-2-2. TER 測定

培養の際、EVOM ボルトオームメーターと STX-2 電極(World Precision Instruments, Inc, Sarasota, FL, USA)(Table.3-2)を用いて膜間電気抵抗値(TER: Transepithelial electrical resistance)の測定を行った(Fig.3-2)。STX-2 電極は 2 本の電極対で構成され、外側の電極は、試料膜を介して電流を流すための微小な銀電極、内側の電極は微小な銀／塩化銀電極で電圧検知用±20μA の交流矩形波電流を 12.5Hz の低周波で流し、膜間の電圧を測定することでオームの法則 $R = E/I$ より抵抗値を算出した。

測定に先立ち、STX-2 電極は 70%エタノールに 10 分浸漬し、殺菌処理をした。TER 測定値は、Transwell に細胞を播種せず培地のみ浸した状態の抵抗値を Blank とし、その差から求めた。同時に位相差顕微鏡による観察も行い、TER との関係を評価した。

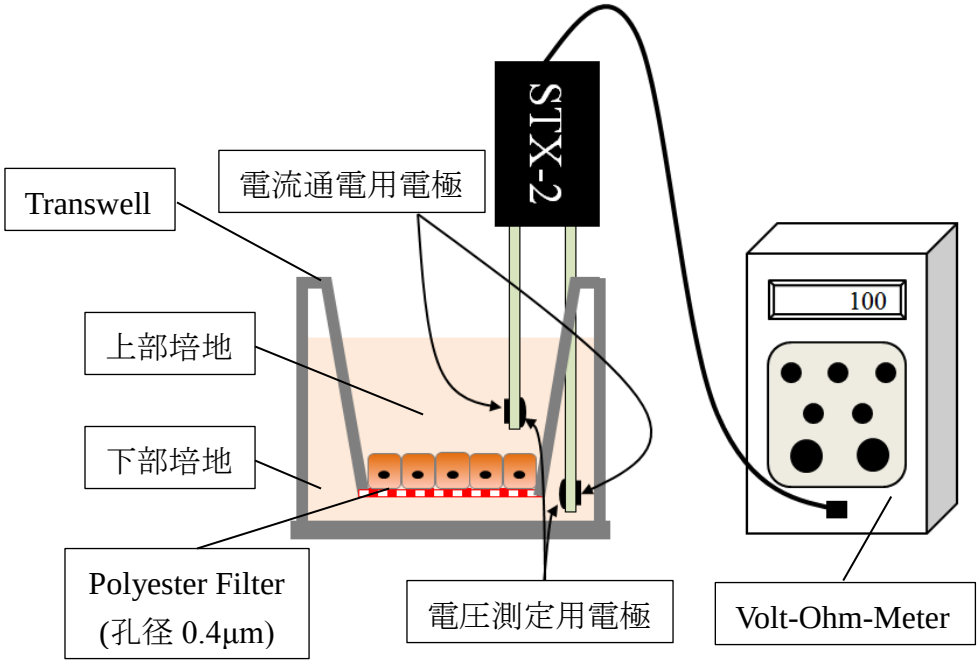


Fig.3-3 TER 測定装置図

Table.3-2 EVOM / STX-2 電極の装置概要

膜電圧範囲	±199.9mV
抵抗範囲	0~1999Ω, 0~20kΩ の 2 レンジ
交流矩形波電流	±20μA, 12.5Hz
電極	銀／塩化銀電極（電圧測定用） 銀電極（電流通電用）

3-2-3. TGF-β1 添加による TER 測定

9 日間 Transwell 上で培養し、コンフルエント状態となった細胞に対して 0.1%FBS/M199 を加えることで Growth Arrest を行った。10 日目に、緒言(1-3-3. EMT 誘導因子)でも紹介があった TGF-β1(10ng/mL)を添加することで、その細胞の TER 測定値の変化を観察した。

3-3. 免疫蛍光染色による PDE-HPMC の Cytokeratin-18、α-SMA タンパク発現測定

腹膜透析由来接着細胞の特異タンパク発現は免疫化学蛍光染色によって測定した。特異タンパクとして中皮細胞マーカーである Cytokeratin-18 及び形質変換マーカーである α-SMA に着目した。免疫化学蛍光染色は生体材料化学研究室の共通プロトコル(10.Appendix)に従って行なった。ここではその概略を記す。

PDE-HPMC を φ35 シャーレ及びセルデスク上でサブコンフルエントまで培養し、培地を吸引し PBS で洗浄した後、aceton/methanol によって固定した。次に、1% BSA/PBS でブロッキングし、希釈倍率 1 : 200 で希釈した Anti-cytokeratin-18 mouse mono antibody (Funakoshi, Japan)及び anti-human smooth muscle actin antibody (Dako, Glostrup, Denmark)一次抗体溶液を添加し、4℃で overnight 反応させた。その後、1% BSA/PBS で 3 回洗浄し、希釈倍率 1 : 200 で希釈した二次抗体 Goat anti-mouse IgG(H+L) FITC conjugate antibody (Millipore, MA, USA)と反応させた。サンプルは走査型共焦点レーザー顕微鏡(Fluoview FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)によって観察した。タンパク陽性率はそれぞれランダムに撮影された画像から少なくとも 100 個の細胞数をカウントすることによって測定した。

3-4. TGF-β1 および BMP-7 添加による Cytokeratin-18、E-cadherin、Snail mRNA の継時的測定

腹膜透析排液より採取した PDE-HPMC の TGF-β1 および BMP-7 添加モデルにより、mRNA の抽出を行い、Cytokeratin-18、E-cadherin、Snail mRNA 発現量の継時的測定を行った。Acid Guanidium-Phenol-Chloroform(AGPC)法、RNA 定量法、RT-PCR 法、アガロースゲル電気泳動法は、Appendix A-5 に記した生体材料化学研究室共通 Protocol に従って行った。ここでは簡潔にその概略を述べる。

3-4-1. AGPC 法による mRNA の抽出と定量

PDE-HPMC に対して TGF-β1 を添加したモデルに RNA iso plus(TaKaRa)を 1mL/well 加えて細胞を掻き取った。Chloroform-isoamylalcohol 24:1 (SIGMA)を 200μL 加え 15 分静置した(R.T)。12000G/4℃/15 分にて遠心分離し、最上層より 350μL 採取、その後 isopropanol を 500μL 加えて 12000G/4℃/10 分で遠心分離し、上澄みを除去して 75%EtOH/DEPC 処理水を 500μL 加え、さらに 10000G/4℃/5 分で遠心分離した。再び上澄みを除去し、減圧乾燥後 DEPC 処理水を 10μL 加え、55℃/5 分加温後、4℃に冷却した。Smart Spec^{TM} 3000 Spectrophotometer (BIO RAD)を用いて各サンプルの mRNA を定量した。

3-4-2. mRNA の逆転写による cDNA 作製と PCR による Cytokeratn-18、E-cadherin、Snail cDNA の増幅

mRNA の定量結果を基にして、全サンプルの mRNA 濃度を統一とした。これらの mRNA を Super Script^{TM} RNase H^{-} Reverse Transcriptase (Invitrogen)および Random Primers (Invitrogen)を用いて cDNA に逆転写した(RT Product の作製)。得られた RT Product 2μL と、各種 Primer(Table.3-3 に記載)および AmpliTaq Gold^{TM} DNA polymerase (Applied Biosystems)を含む PCR Master Mix を 48μL 混合し、サンプル内の cDNA を PCR により増幅させた(PCR product の作製)。等量の cDNA が用いられているかを確認し、PCR product を半定量化するため、内部標準として House Keeping Gene である GAPDH を使用した。

Table.3-3 Primer List

Primer		Sequence	Cycles	Size
GAPDH[40]	sense	5'-CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC-3'	27	322 bp
	antisense	5'-GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT-3'		
Cytokeratin-18[41]	sense	5'-TCA GCA GAT TGA GGA GAG CA-3'	33	425 bp
	antisense	5'-TCT GAC TCA AGG TGC AGC AG-3'		
E-cadherin[42]	sense	5'-TCC CAT CAG CTG CCC AGA AA-3'	36	500 bp
	antisense	5'-TGA CTC CTC TGT TCC TGT TA-3'		
Snail[42]	sense	5'-TCA GAC GAG GAC AGT GGG AAA G-3'	38	487 bp
	antisense	5'-GCT TGT GGA GCA GGG ACA TTC-3'		

3-4-3. アガロースゲル電気泳動およびバンドの定量

PCR による増幅後、3%wt/vol Agarose gel と、0.3μg/mL の ethidium bromide を含む 600mL の 1x Tris-acetate-EDTA buffer 泳動液を用いて、80V/80mA/60 分の条件で PCR product 10μL の電気泳動を行った。泳動後、イメージアナライザー(TOYOBO)にて jpg 型式でゲルの画像を撮影し、画像解析ソフト Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™ (Media Cybernetics®)を用いてバンドの輝度を定量化した。結果は GAPDH の値に対する Cytokeratin-18、E-cadherin、Snail の値の比として示した。

3-5. 二次元電気泳動

二次元電気泳動は生体材料化学研究室の共通 Protocol に従って行った。ここでは簡潔にその概要について述べ、詳細については Appendix A-7 を参照としてほしい。

3-5-1. 溶液調整

φ35mm シャーレでコンフルエントまで培養した PDE-HPMC を PBS で 2 回洗浄し、PBS を 1mL 入れた状態でセルスクレーパーをして細胞を集め、5000rpm/4℃で 5 分遠心分離させた。その後、上澄みの PBS を完全に取り除いて細胞の質重量を量り、その質重量に対して 4 倍量のタンパク抽出液を加えた後、氷冷下で超音波破砕し、15000rpm/4℃で 20 分遠心分離した。この上澄みを採取し、試料とした。

3-5-2. 等電点電気泳動(一次元目)

前日にゲル膨潤液で膨潤させておいた一次元目のゲルストリップ(Immobiline DryStrio pH4-7NL, 18cm)を取り出し、一次元目ゲル電気泳動槽にセットし、Milli-Q を染み込ませた電極用ろ紙を一次元目のゲルストリップゲルの両端にセットした。試料塗布用ろ紙に抽出した試料を染み込ませ、電極用ろ紙の 1mm 離した場所にセットした後に、白金線の付いた電極とサンプルアタッチメントを取り付けた。空気との遮断のため、シリコンオイルを約 150mL~200mL 流し込んだ後、電源装置とつなぎ、プラグラム通り 18 時間の等電点電気泳動を行った。等電点電気泳動のプログラムは Table.3-4 に記した。

Table.3-4 等電点電気泳動のプログラム

ステップ	モード	設定電圧	設定電流	時間
1	V	500V	250mA	2:00M
2	SG	3500V	2mA	6:00M
3	SV	3500V	2mA	10:00M
4	SV	3500V	2mA	∞

3-5-3. SDS-電気泳動(二次元目)

一次元目の泳動が終わったゲルストリップを前日に作って置いた SDS 処理液に入れ、30 分間振とうさせた後、アルキル化処理液に入れ 15 分間振とうさせた。その間に、10%アクリルアミドゲルを二次元目電気泳動槽にセットした。アルキル化が終了したゲルストリップの端を切り取り、二次元目のアクリルアミドゲルの上にゲル面が内側になるように載せ、ゲルが浮き上がらないようにゲルストリップの上にシャークコームを載せた。その後、Tris-Glycine バッファーを陽極、陰極の両方に同じ高さになるように入れ、電源装置とつなぎ、最初は 20mA、その後は 30~40mA の定電流で電気泳動を行った。

3-5-4. Flamingo による蛍光染色および画像解析方法

Flamingo ゲルステインは、翻訳産物であるタンパク質を解析する 1 つのツールである。二次元電気泳動で得たゲルを固定液で浸し、30 分振とうした。Milli-Q で 3 回洗浄した後、10 倍希釈した Flamingo 染色液でゲルを浸し、1 時間振とうさせた。染色が終わり次第、Milli-Q で 1 回洗浄し、予め準備してあったクリアファイルに挟み、遺伝子実験施設の蛍光撮影機によりスポット検出を行った。

二次元電気泳動を行って得られたゲルを解析するため、フルオロホレスター3000 Ver3.1 を用いて画像解析を行った。また、2 つのゲル染色画像をマッチングさせて比較するため、Progenesis PG200/PG220 解析ソフトウェアを使用した。

3-6. 統計処理

統計的な有意性は StatView®-J 5.0(SAS 社)を使用した。Control に対する有意差を出す際には、t 検定(対応あり)で試験を行い、Control 以外のデータの比較の際には、t 検定(対応なし)で試験を行うことで確率値(P 値)の算出を行い、P 値<0.01 を有意と認識した。

4. 結果

4-1. PDE-HPMC のキャラクタリゼーション

4-1-1.初期細胞接着率および細胞形態変化

透析排液中から採取した PDE-HPMC のうち、プラスチック培養シャーレ(φ35 シャーレ)に接着した細胞の割合は約 3.1%であり、過去の報告[2]と同等の値を示した。また、患者毎でバラつきが生じているが有意な差は見られなかった(Fig.4-1)。

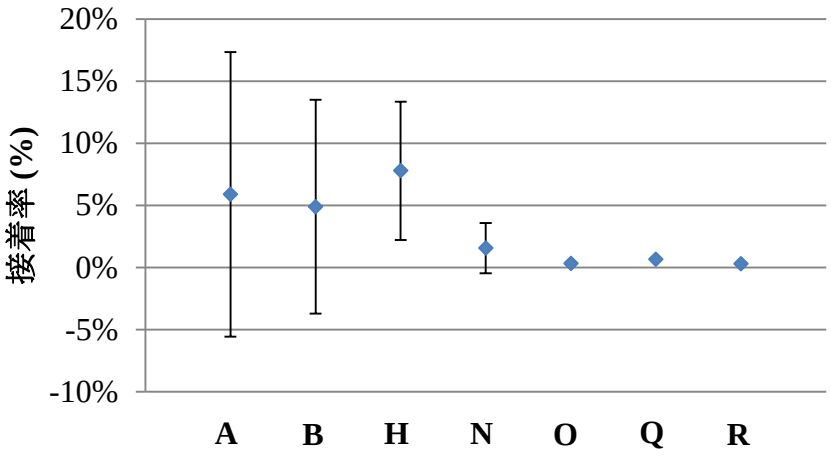
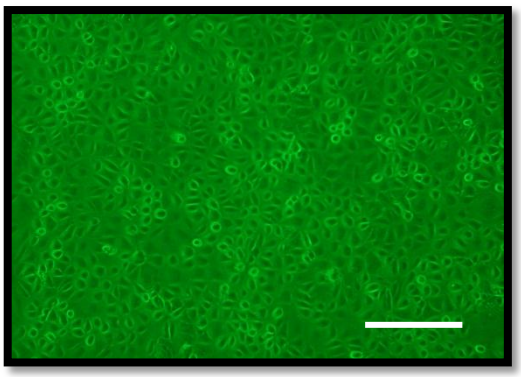
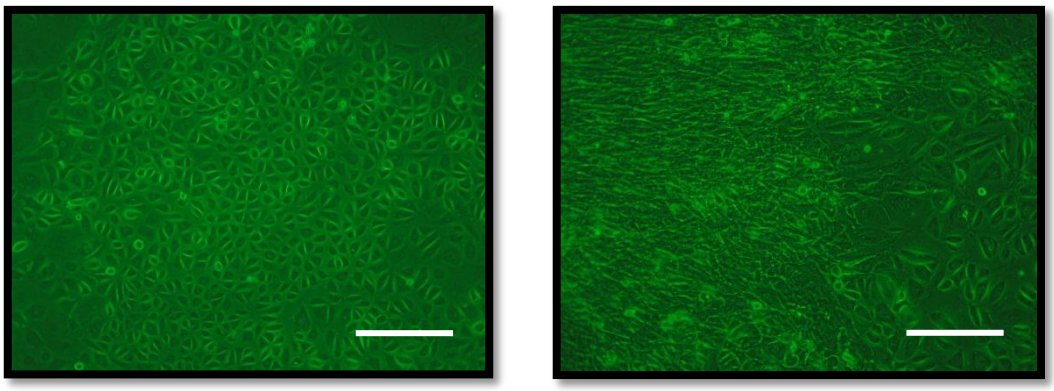


Fig.4-1 患者毎に比較した細胞接着率

PDE-HPMC をコンフルエントまで培養した際の形態は、OM-HPMC と類似した玉石状の細胞形態を示した PDE-HPMC に限らず、紡錘状を示す PDE-HPMC の両者が含まれていることが示された (Fig.4-2(A)(B)(C))。



(A)OM-HPMC



(B)PDE-HPMC(玉石状)　　(C)PDE-HPMC(紡錘状)

Fig.4-2 OM-HPMC と PDE-HPMC の形態　(倍率:×100、scale bar = 250μm)

既報によると、透析期間の増加に伴い紡錘状の形態を示す HPMC が多くなるといった結果が得られているが[11]、本研究では透析期間が 13 ヶ月以上の長期のサンプルであっても、玉石状の形態を示す HPMC の割合が高い、すなわち玉石状の形態を維持することが確認された(Fig.4-3)。以上の結果は、共同研究者(阿部)と共に行った。

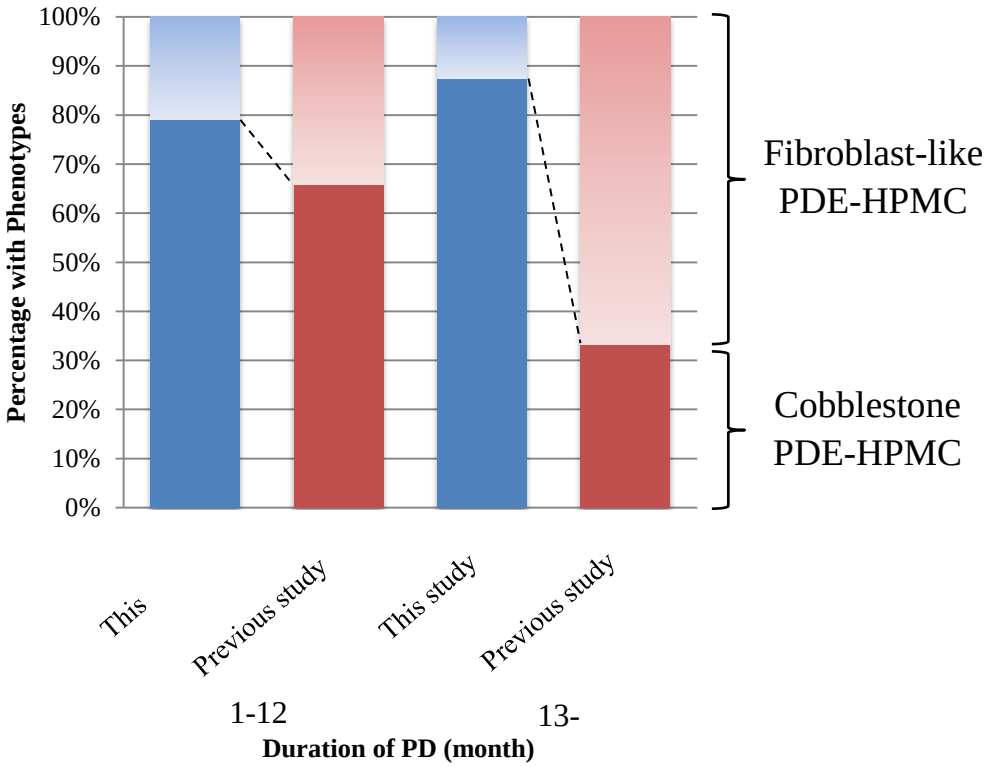


Fig.4-3 透析期間別の玉石状と紡錘状 PDE-HPMC の割合

4-1-2. 細胞面積変化

PDE-HPMC の面積変化を継代別に示したものを Fig.4-4 に示す。Passage0-3 において有意に肥大化することが示された。早期に細胞面積肥大化が見られることから、OM-HPMC より早期に細胞機能の劣化が見られ、もともと細胞機能が低下した細胞の混在が示唆された。

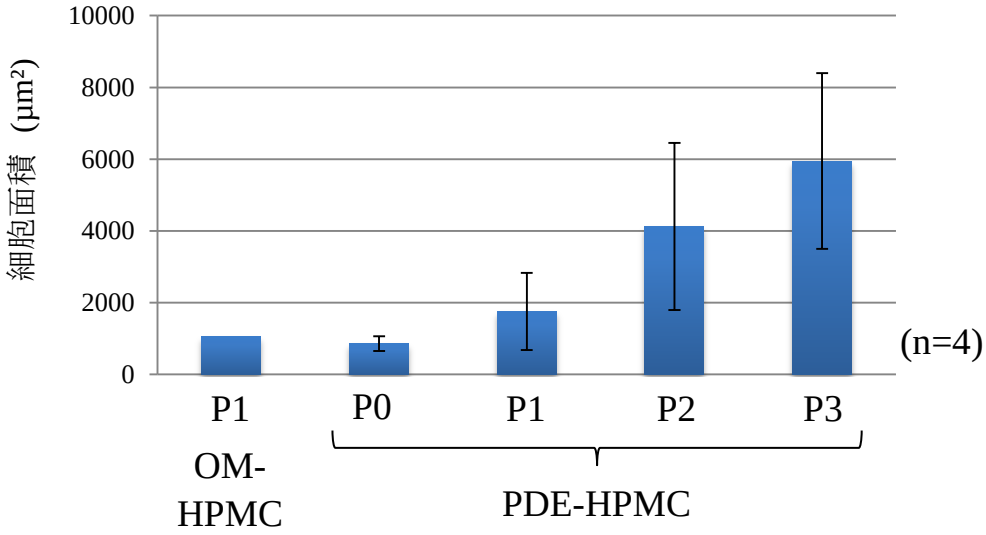


Fig.4-4 継代別 PDE-HPMC 面積変化

4-2. TER 測定

4-2-1. PDE-HPMC の TER 測定値

過去の研究により、正常組織 OM-HPMC の TER 測定が行われ、TER 測定値は 32±1Ω･cm^2 を示した[43]。それに対し、PDE-HPMC の TER 測定値は 21±3Ω･cm^2 (n=42)を示し、OM-HPMC と比べて約 11Ω･cm^2 低く、両者の間に有意な差が生じた(Fig.4-5)。また、比較対象として測定した間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)(10±1Ω･cm^2)に比べて 38%高い値となった(Fig.4-5、Table.4-2)。これらの結果より、PDE-HPMC は細胞間結合形成能が低下した細胞、そして細胞間結合を保持した細胞が混在している可能性が示唆された。

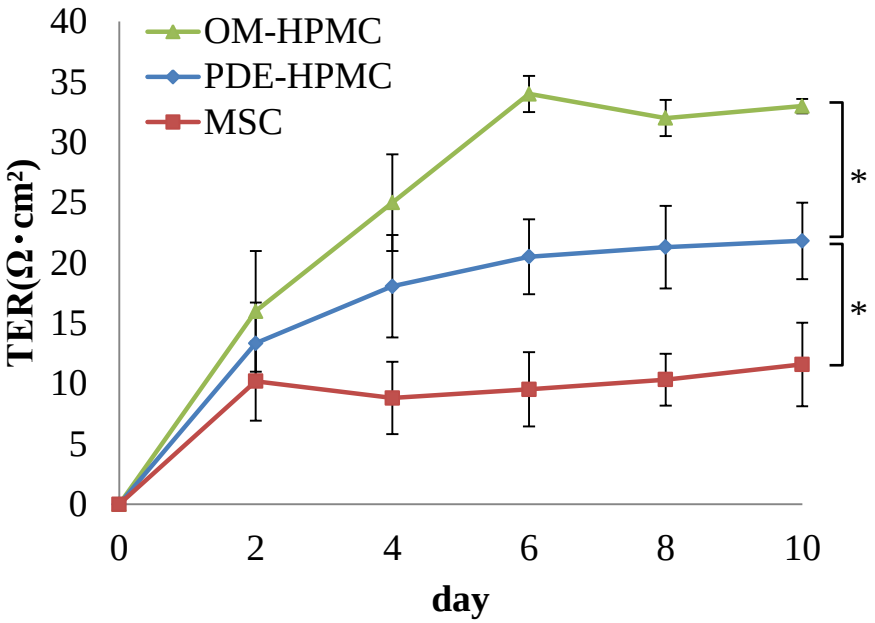


Fig.4-5 OM-HPMC、PDE-HPMC、MSC における
TER 測定値の継時的変化(*:P<0.01)

Table.4-2 TER 測定値

	OM-HPMC (n=3)	PDE-HPMC (n=42)	MSC (n=9)
TER(Ω・cm²)	32±1	21±3	10±1

4-2-2. TGF-β1 添加した際の PDE-HPMC の形態変化および TER 測定値

培養 9 日目に 0.1% FBS/M199 で 24h Growth Arrest を行い、10 日目に EMT 誘導因子 TGF-β1 を 10ng/mL の濃度で添加し、形態変化および TER 値の変化を記録した。

コンフルエントに培養した PDE-HPMC に TGF-β1 を添加したときの細胞形態変化を、位相差顕微鏡により撮影した(Fig.4-6)。PDE-HPMC は TGF-β1 添加直後(0h)では細胞間接着がしっかりしており、玉石状の形態を示す HPMC が多くみられる。しかし、TGF-β1 添加後の時間経過に伴い、細胞間が離れ、形態が紡錘状へと変化したことが分かる。

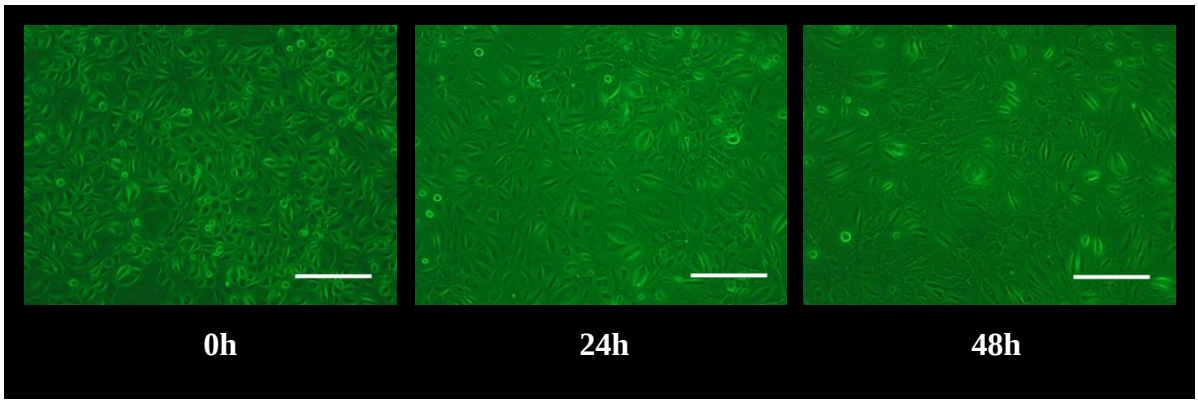


Fig.4-6 TGF-β1 添加による PDE-HPMC の経時的形態変化(scale bar = 250μm)

Fig.4-7 では TER 値の継時的変化を示した。過去の研究結果において、OM-HPMC に対して TGF-β1 を添加した際の抵抗値は 20±0.4Ω･cm^2(n=3)へと減少し、一定となった[43]。一方 PDE-HPMC では、TGF-β1 添加後 11±2Ω･cm^2 まで減少した後、一定となった。しかしながら、比較対象として用いた MSC では、TGF-β1 を添加した 10 日以降も抵抗値の変化はなく、TGF-β1 による影響は見られなかった。

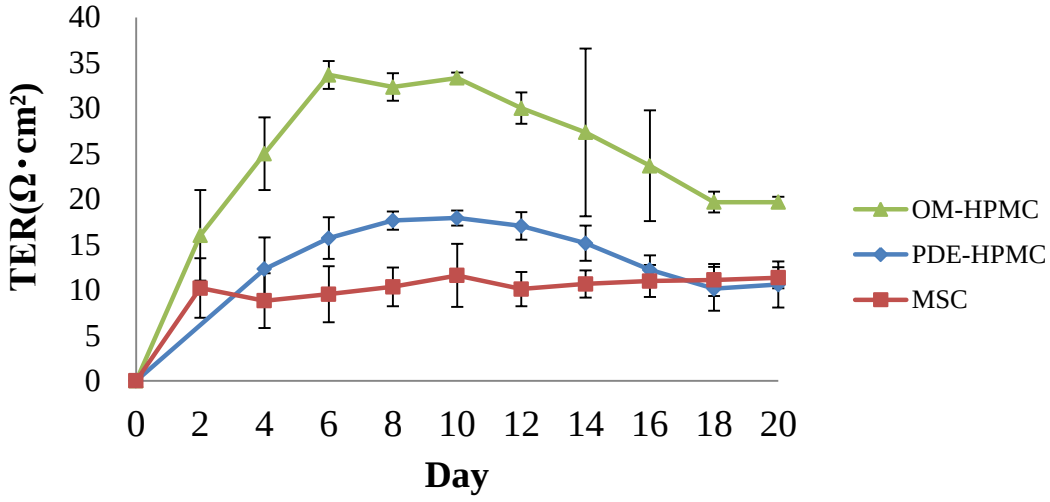


Fig 4-7. TGF-β1 添加した際の TER 測定値の変化
OM-HPMC(n=3)、PDE-HPMC(n=4)、MSC(n=5)

Fig.4-8 では、TGF-β1 添加前後における OM-HPMC、PDE-HPMC、MSC 各々の TER 値の変化をまとめた。この結果、TGF-β1 添加後一定となった PDE-HPMC および TGF-β1(+)OM-HPMC の TER 値との間に有意な差が生じた。また、

TGF-β1(+) PDE-HPMC および TGF-β1(-) MSC の TER 値との間に差は見られなかった。このことから、PDE-HPMC は TGF-β1 の影響により細胞間結合が消失し、細胞間結合を持たない MSC と類似した形態変化を遂げる、即ち EMT が生じたことが示唆されている。また、OM-HPMC、PDE-HPMC、MSC 各々の TER 値の差(⊿TER 値＝TGF-β1 添加前－TGF-β1 添加後)は、13±2Ω･cm^2、6±2Ω･cm^2、-2±1Ω･cm^2 となり、OM-HPMC と PDE-HPMC の⊿TER 値に差が生じた。

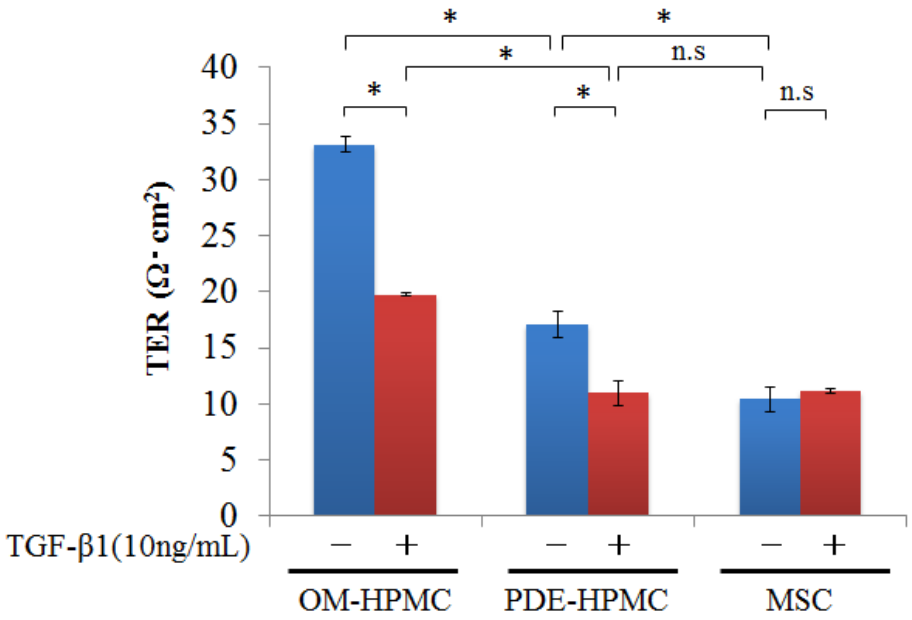


Fig 4-8. 各細胞の TER 測定値の比較
(OM-HPMC: n=3, PDE-HPMC: n=4, MSC: n=5)

4-3. 免疫蛍光染色(Cytokeratin-18, α-SMA,)

4-3-1. Cytokeratin-18 タンパク陽性率

サブコンフルエントに培養した PDE-HPMC に対し、中皮細胞マーカーである Cytokeratin-18 タンパク質の染色を行った。Cytokeratin-18 陽性率は、平均で 97±3.1%となり、排液中の殆どの細胞が腹膜中皮細胞であるということが確認された (Fig.4-9)。

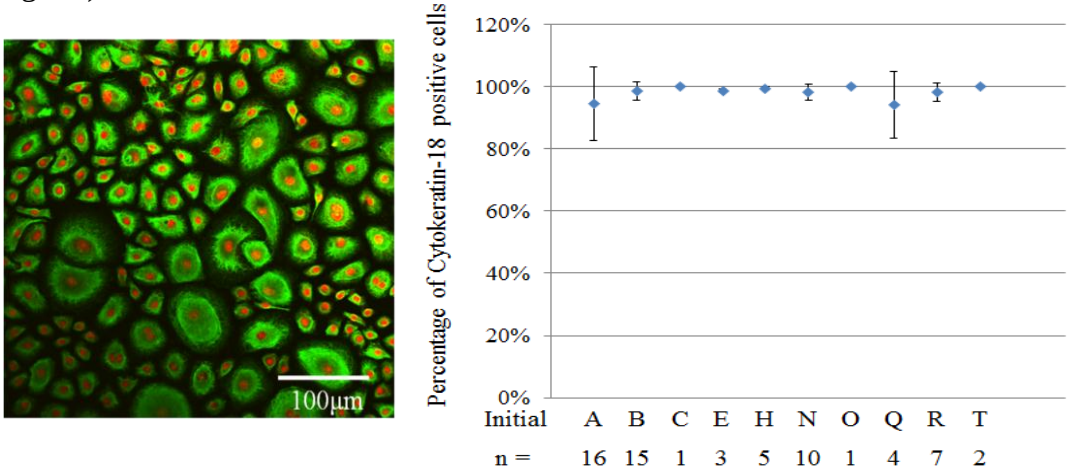


Fig.4-9 Cytokeratin-18 染色写真(赤:核、緑:Cytokeratin-18)および患者別に見た Cytokeratin-18 陽性率

4-3-2. α-SMA タンパク陽性率

形質変換マーカーである α-SMA に関しては、患者毎の多少のバラつきはあるが、有意な差は見られず、平均すると約 30%の陽性率を示していることが明らかとなった(Fig.4-10)。このことから、PDE-HPMC 中には多少なりとも EMT が生じた細胞の混在していることが示された。以上の染色結果は、共同研究者(阿部)と共に行った。

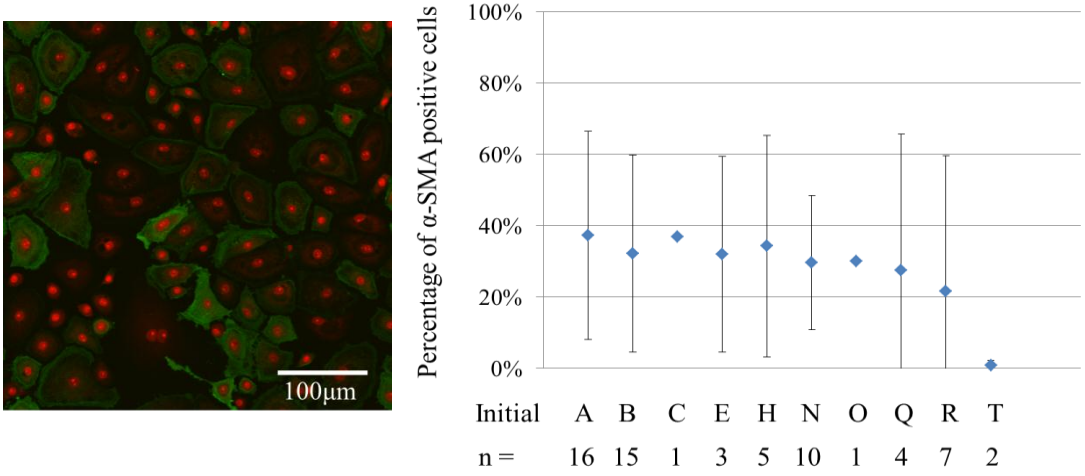


Fig.4-10 α-SMA 染色写真(赤:核、緑:α-SMA)および患者別に見た α-SMA 陽性率

4-3-3. α-SMA と TER 測定値との関連性

TER 値が低下すると、形質変換マーカーである α-SMA 陽性率が上昇する傾向が見られ、両者の間に若干の逆相関の傾向がみられた(R=－0.32)。このことから、細胞間結合と細胞内に存在するアクチンとの関連性が示唆された(Fig.4-11)。

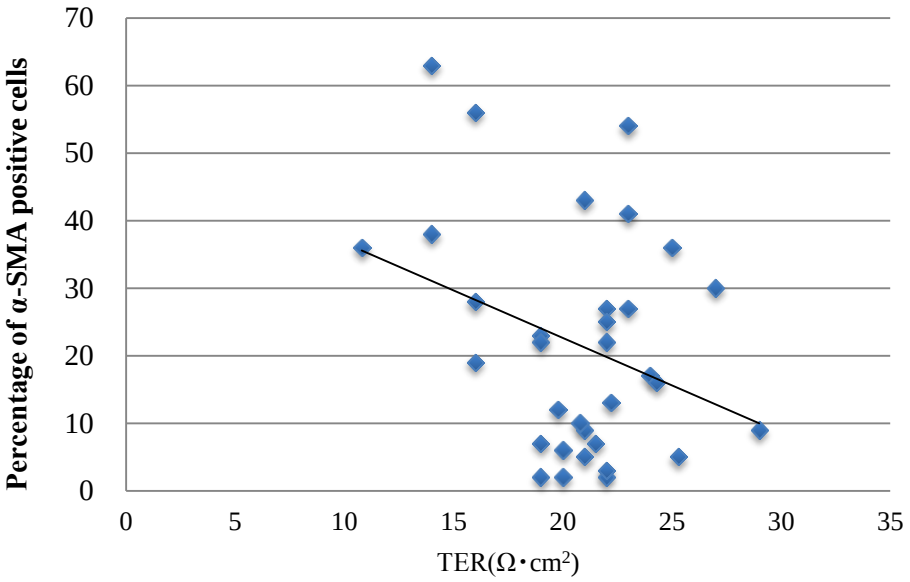


Fig.4-11 TER 測定値 vs. α-SMA 陽性率 (n=33)

4-4. PDE-HPMC の TGF-β1 および BMP-7 添加モデルによる Cytokeratin-18、E-cadherin、Snail mRNA の経時的変化

ここでは、TGF-β1 を添加し EMT 誘導させた PDE-HPMC の遺伝子発現の変化を RT-PCR にて測定した。今回用いた Primer は、中皮細胞の中間径フィラメントを構成する Cytokeratin-18、細胞間結合の Adherence Junction に存在する E-cadherin、EMT の際に細胞間結合の損失に繋がるシグナル経路の一部である Snail に関して実験を行った。これらの mRNA 発現結果に用いた値は、RT-PCR 法により測定した各々の発現量を、内部標準である GAPDH mRNA の発現量で除し、Control が 1 となるように補正を行った。

4-4-1. TGF-β1 添加による Cytokeratin-18 mRNA 発現

Fig.4-12 に 10ng/mL TGF-β1 を添加した際の Cytokeratin-18 mRNA 発現の時間変化を示す。通常培地(10%FBS/M199)にて培養した CTL (TGF-β1 0h)の Cytokeratin-18 mRNA と比較し、TGF-β1 添加後の発現量に変化は認められなかった。

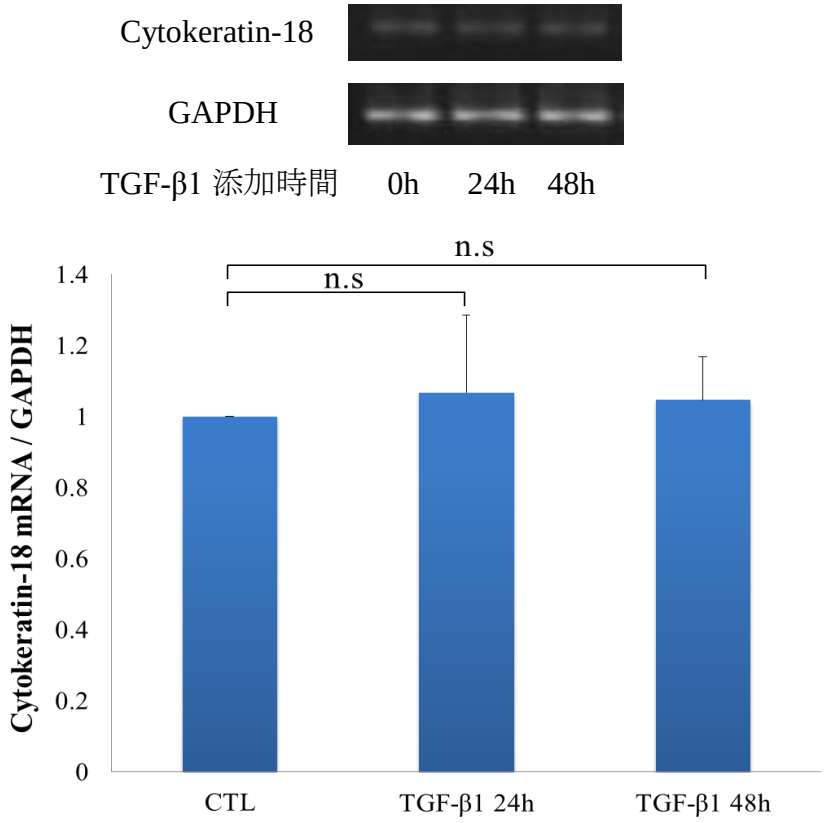


Fig.4-12 TGF-β1 添加における Cytokeratin-18 発現の継時的変化(n=3)

4-4-2. TGF-β1 添加による E-cadherin mRNA 発現

Fig.4-13 に 10ng/mL TGF-β1 を添加した際の細胞間結合タンパク質 E-cadherin mRNA 発現の時間変化を示す。TGF-β1 添加に対して E-cadherin mRNA 発現は、添加後 24h で急速に減少し、CTL の約 0.5 倍の発現の減少を示した(*:P<0.01)。

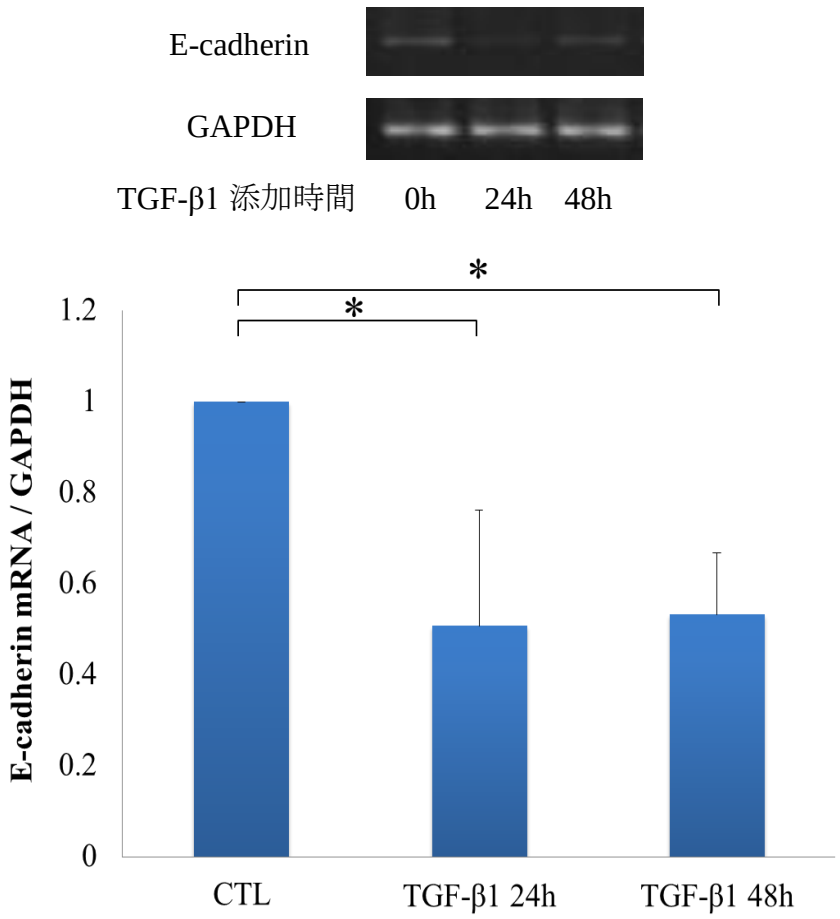


Fig.4-13 TGF-β1 添加における E-cadherin 発現の継時的変化(n=3) (*:P<0.01)

4-4-3. TGF-β1 添加による Snail mRNA 発現

Fig.4-14 に 10ng/mL TGF-β1 を添加した際の Snail mRNA 発現の時間変化を示す。TGF-β1 による形質変換誘導に対して、Snail mRNA 発現量は時間依存的に増加し、TGF-β1 誘導 48h 後では、CTL の約 2.8 倍の発現量を示した(*:P<0.01)。

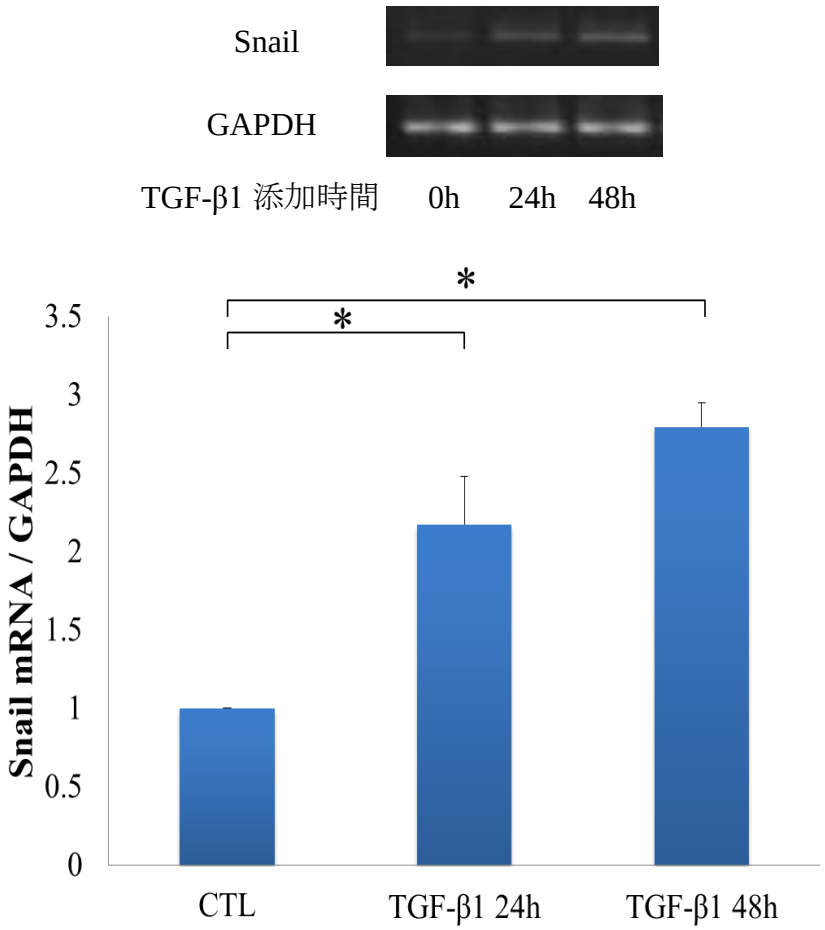


Fig.4-14 TGF-β1 添加における Snail 発現の継時的変化(n=3) (*:P<0.01)

4-4-4. Cytokeratin-18 と E-cadherin との関連性

Fig.4-15 では Cytokeratin-18、E-cadherin の mRNA を観察し、5 名の患者毎にまとめ、平均値を算出したグラフを記す。それぞれの患者間で mRNA 発現量に有意な差はみられず、どの患者も同じ程度の値を示すことが明らかとなった。

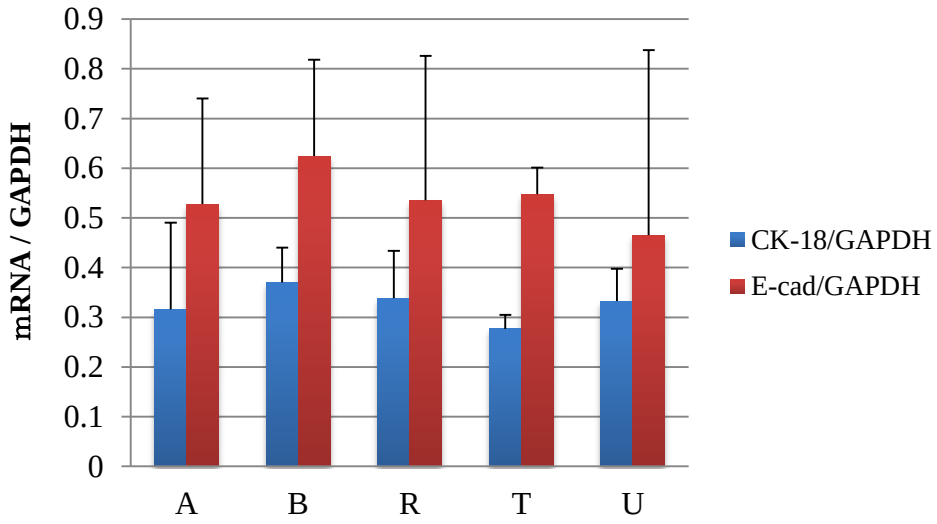


Fig.4-15 患者毎の発現量の比較
(A: n=3、B: n=3、R: n=3、T: n=2、U: n=2)

また、Cytokeratin-18 および E-cadherin mRNA 発現量を示したグラフを下図に示す(Fig.4-16)。両者の間には高い正の相関性(R=0.67、n=12)がみられ、細胞間結合と中間系フィラメントとの間に強い関連性が見出された。これは、患者毎のグラフにおいてもほとんどの患者で正の相関を示していることからも強く示唆されている。

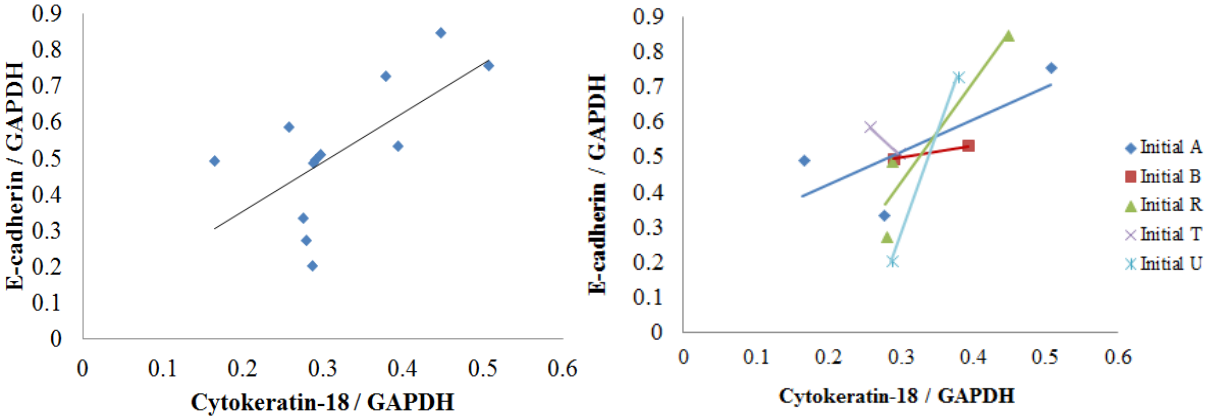


Fig.4-16 Cytokeratin-18 と E-cadherin の相関関係(左:全サンプル、右:患者毎)

4-4-5. BMP-7 添加による各 mRNA 発現の経時的変化

1-3-2 で述べたように、BMP-7 は MET 誘導を促す因子として非常に注目されているが、本研究では PDE-HPMC においても BMP-7 が MET 誘導因子として機能を果たすかどうかを検証した。4-1-1 や 4-2-2 の結果から、PDE-HPMC 中には EMT が生じた細胞の混在が示唆されたため、TGF-β1 による EMT 誘導を行わず、BMP-7 (10ng/mL)のみを添加し、Cytokeratin-18、E-cadherin、Snail に大きな変化が生じるかを測定した(Fig.4-17) (n=3)。その結果、Cytokeratin-18、E-cadherin、Snail の mRNA 発現は、いずれも CTL と有意な差を示さなかった。

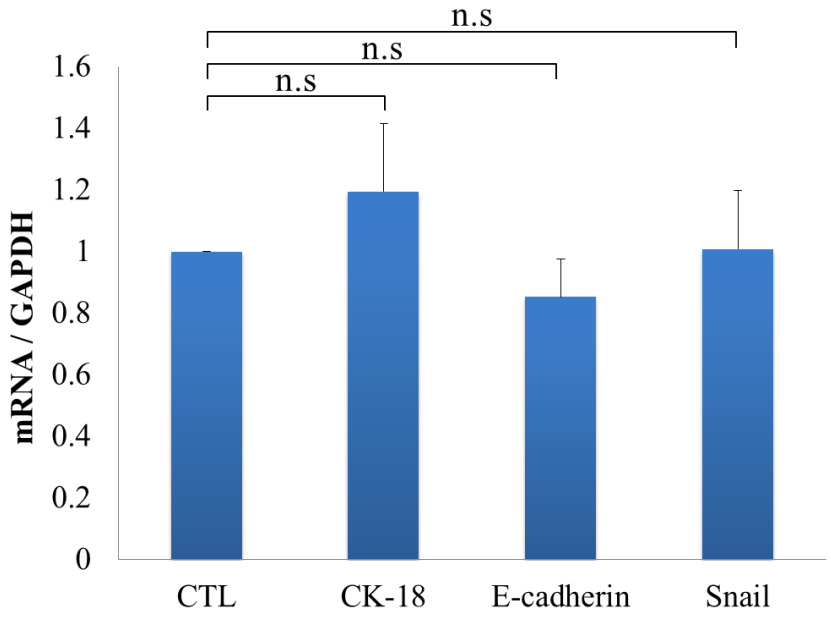


Fig.4-17 BMP-7 48h 添加モデルによる mRNA 発現量の変化(n=3)

さらに BMP-7 が PDE-HPMC に与える影響を考察するため、BMP-7 を 24h 添加した後に TGF-β1 を 24h 添加した際の mRNA の変化を測定した。4-4-1 において TGF-β1 を添加した際の Cytokeratin-18 mRNA は不変であったため、この実験では E-cadherin、Snail mRNA の 2 つに着目した。実験条件は以下の通りである。

- Control (通常培養)
- 10ng/mL TGF-β1 (24h)
- 10ng/mL BMP-7 (24h) → 10ng/mL TGF-β1 (24h)

4-4-2 および 4-4-3 の結果と同様に、TGF-β1 を 24h 添加した際の E-cadherin mRNA は減少し、Snail mRNA は増加した(Fig.4-18)。それと比較し、BMP-7 を 24h 添加した後に TGF-β1 を 24h 添加した系では、E-cadherin mRNA 発現量は TGF-β1 を 24h 添加した際の発現量より高く、Snail mRNA 発現量は低い結果となった。

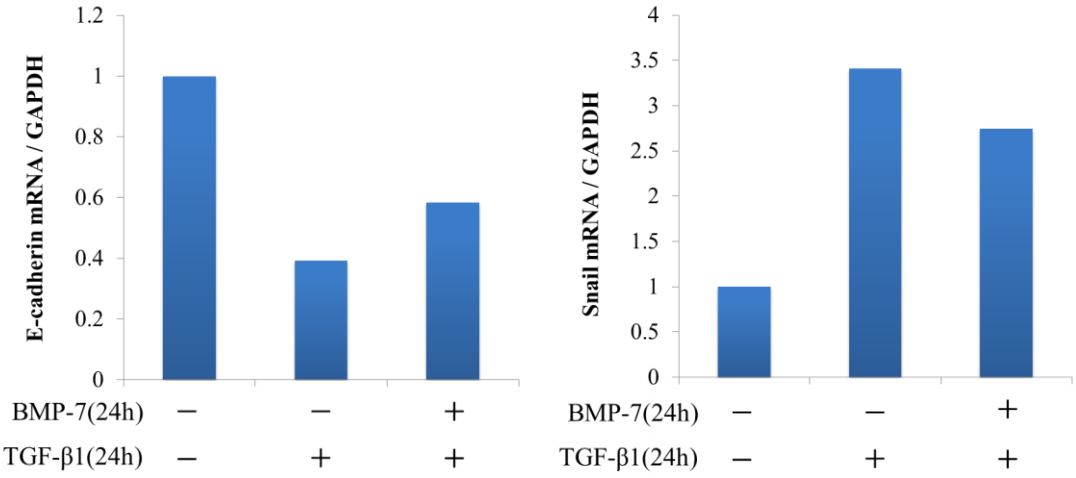


Fig.4-18 BMP-7 添加後に TGF-β1 添加した際の mRNA 発現量の変化(n=2)

4-5.二次元電気泳動

4-5-1. CTL vs. TGF-β1 添加との比較

TGF-β1 添加により細胞間結合タンパク質 E-cadherin の mRNA 減少を受け、通常培養した際の PDE-HPMC のタンパク質(CTL)および TGF-β1 を添加し EMT 誘導させたタンパク質とで変化が生じるかを検証した。

CTL において Spot 数は 400 個であったのに対し、TGF-β1 添加モデルにおける Spot 数は 563 個となり、CTL と比べて比較的多い結果となった(Fig.4-19)。また、両者を重ね合わせた画像から殆どのタンパク質が変化を示さなかったが、同じ露光時間であるため、TGF-β1 添加モデルの方が全体的にタンパク質の発現量が大きいといえる。

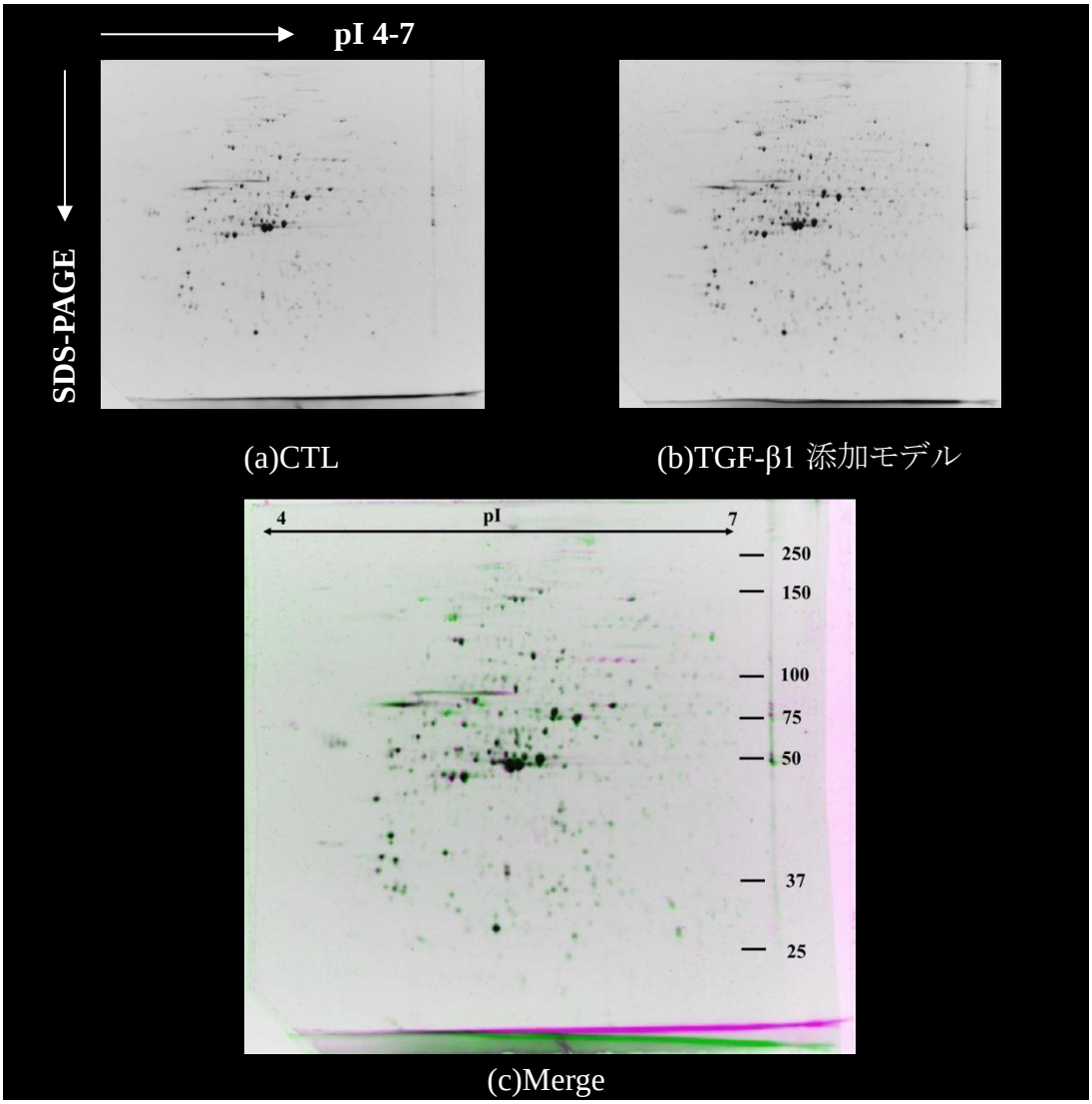


Fig.4-19 (a) CTL の染色写真 (b) TGF-β1 添加モデルの染色写真
(c)Merge(赤:CTL、緑:TGF-β1)

4-5-2. TER 測定値　高い患者 vs.低い患者との比較

4-2-1 での PDE-HPMC における TER 値に基づき、患者毎に平均を算出し、その中で最も抵抗値の高い患者(H-Pt; Initial B)、最も低い患者(L-Pt; Initial A)両者の間で、タンパク質のスポットに変化が生じるかを検証した。

H-Pt および L-Pt との間でタンパク質発現の違いが若干見られ、L-Pt の方が強発現しているスポット、H-Pt の方が強発現しているスポットがそれぞれ見られた(Fig.4-20)。しかし、その個々のスポットがどのようなタンパク質であるかは未だ特定できていない。

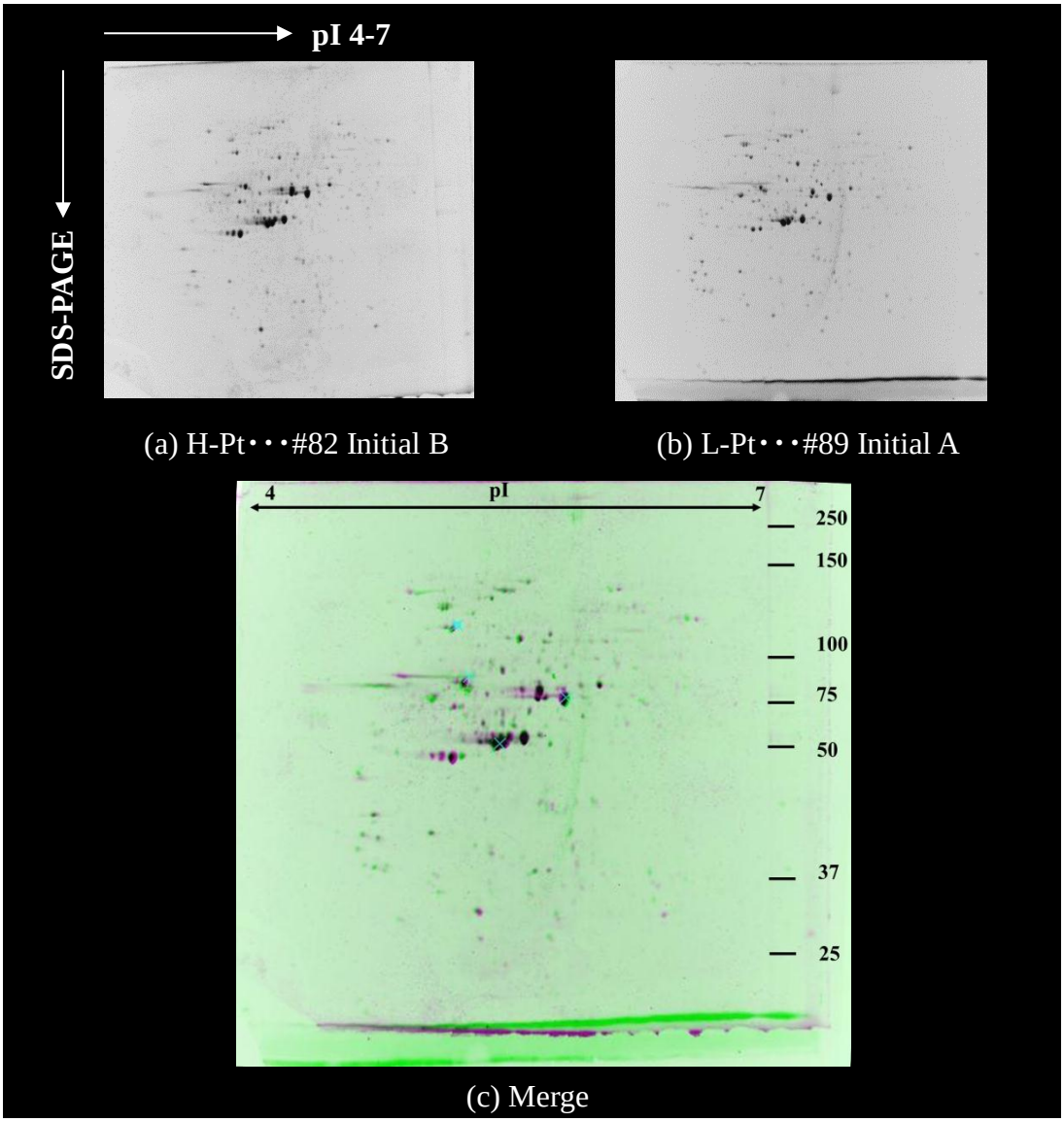


Fig.4-20 (a) H-Pt の染色写真 (b) L-Pt の染色写真
(c)Merge (赤:H-Pt、緑:L-Pt)

5. 考察

5-1. PDE-HPMC の細胞間結合

細胞間結合タンパク質である E-cadherin は、裏打ちタンパクである β-catenin や α-catenin によって支えられて存在している(Fig.5-1)。これらは細胞質において、アクチン細胞骨格と連結しており、構造を安定化させることで細胞極性の維持を担い、細胞と細胞の間隙を充填することで外界からの分子、細菌、イオンなどへの制御機能を有している。本研究において、電気的に細胞間結合を測定する TER 測定の結果により、PDE-HPMC は OM-HPMC と比べて細胞間結合が脆弱な状態であると考えられ、MSC と比べて約 30%高い値を示したことから、細胞間結合が完全に消失した細胞ではないことが示唆された。これより透析排液中には、以下のようなシグナル経路を経て細胞間結合が脆弱となった HPMC が腹膜から脱離し、混在したことが考えられる。

腹膜透析液の主成分は水、電解質および Glucose である。この Glucose 濃度を高めることで浸透圧勾配を作り出し、血液中の余分な水分を取り除く。しかし、この高濃度 Glucose により HPMC では、PKC(Protein Kinase C)の活性化が生じる[44]。そして活性化された PKC により、脱リン酸化した転写因子 c-Fos と c-Jun の複合体(AP-1: activated protein-1)は、TGF-β1 遺伝子上のプロモーター領域の AP-1 結合部位に結合して、TGF-β1 mRNA が発現する[28]。これにより、TGF-β1 の産生が促進され上皮間葉形質変換(Epithelial-to-mesenchymal transition; EMT)が生じ E-cadherin の Downregulation が起こることが明らかとなってきた(Fig.5-2)[9-13]。

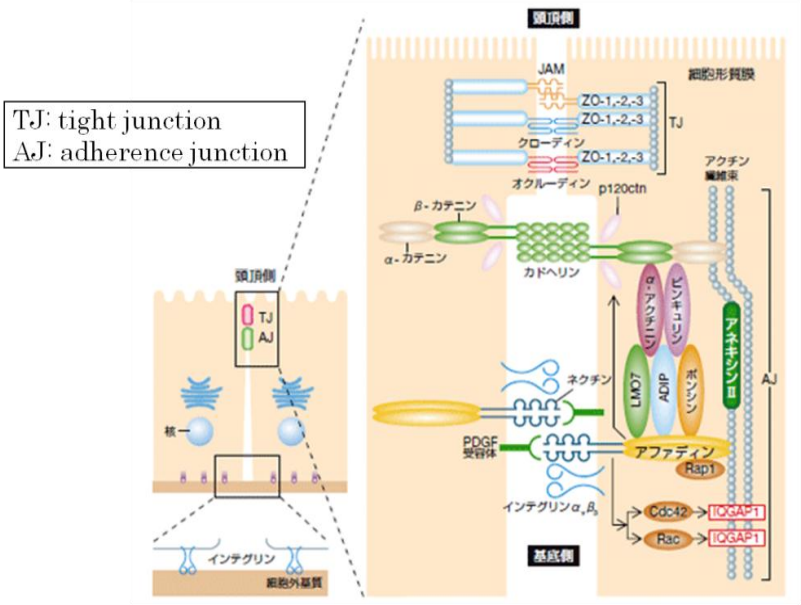


Fig.5-1 細胞間結合の概略図[38]

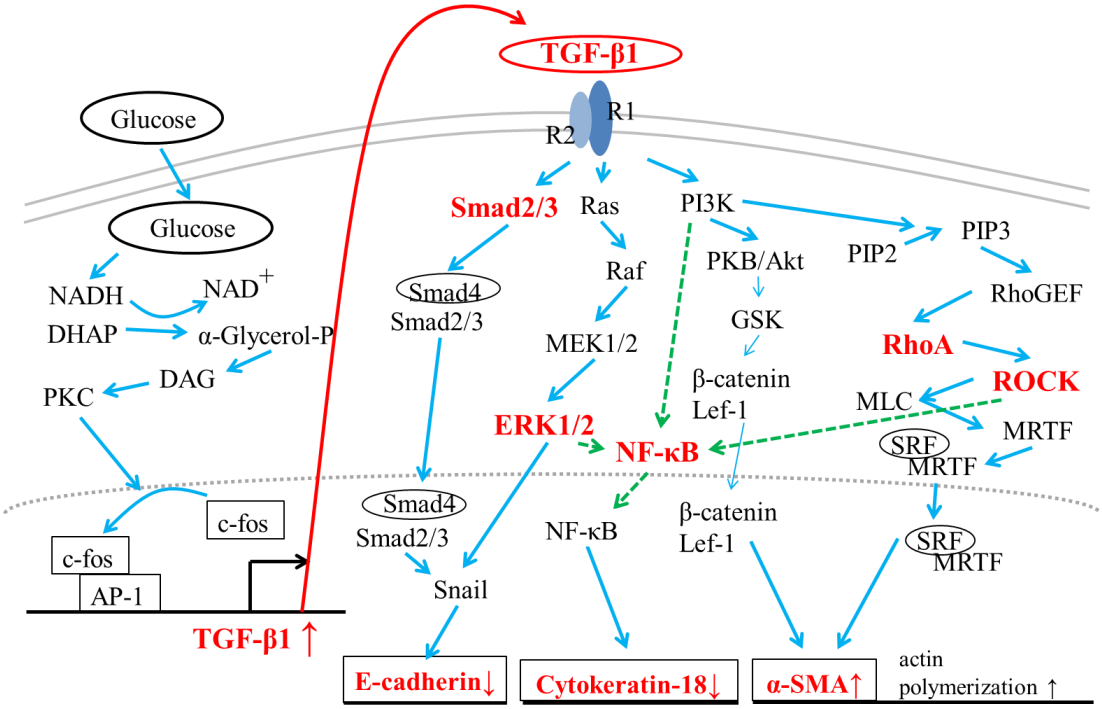


Fig.5-2 高濃度 glucose がもたらす E-cadherin 抑制シグナル[28][36][45-49]

一方で、高濃度 Glucose が活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)を産生し、ここから Snail を通じた E-cadherin 発現の減少を促し、細胞間結合の消失を引き起こす経路も存在する(Fig.5-3)[50][51]。糖化反応はメイラード反応とも呼ばれ、アミノ酸とカルボニル基の間の非酵素的な化学反応であり、アミノカルボニル反応とも呼ばれる。Glucose などの還元糖のカルボニル基がタンパク質やアミノ酸のアミノ基に求電子的に結合し、シッフ塩基を形成する。本段階は不可逆的な反応であるが、引き続きエナミノールを経て、アマドリ転移によって安定なアマドリ化合物となる。その後、アマドリ化合物は、脱水、加水分解、炭素間の開裂により、Methylglyoxal や 3-デオキシグルコソン(3-deoxy-D-erythro-hexos-2-ulosae; 3DG)などの α-ジカルボニル化合物を生成し、それらが最終糖化産物 (Advanced Glycation Endproducts; AGEs)の産生に繋がる。その AGEs が刺激となって細胞内に ROS が産生され、転写因子である Snail を分解へと導く Glycogen Synthase kinase (GSK)-3β を抑制する。Snail は蓄積し核内へ移行後、E-cadherin 抑制へと働くことが予想される。以上、高濃度 glucose により繰り返し、これらのシグナル伝達経路を活性化することが要因となり、透析液中には細胞間結合が弱められ、透析液中へと脱離してしまった腹膜中皮細胞が少なからず存在することが示唆された。

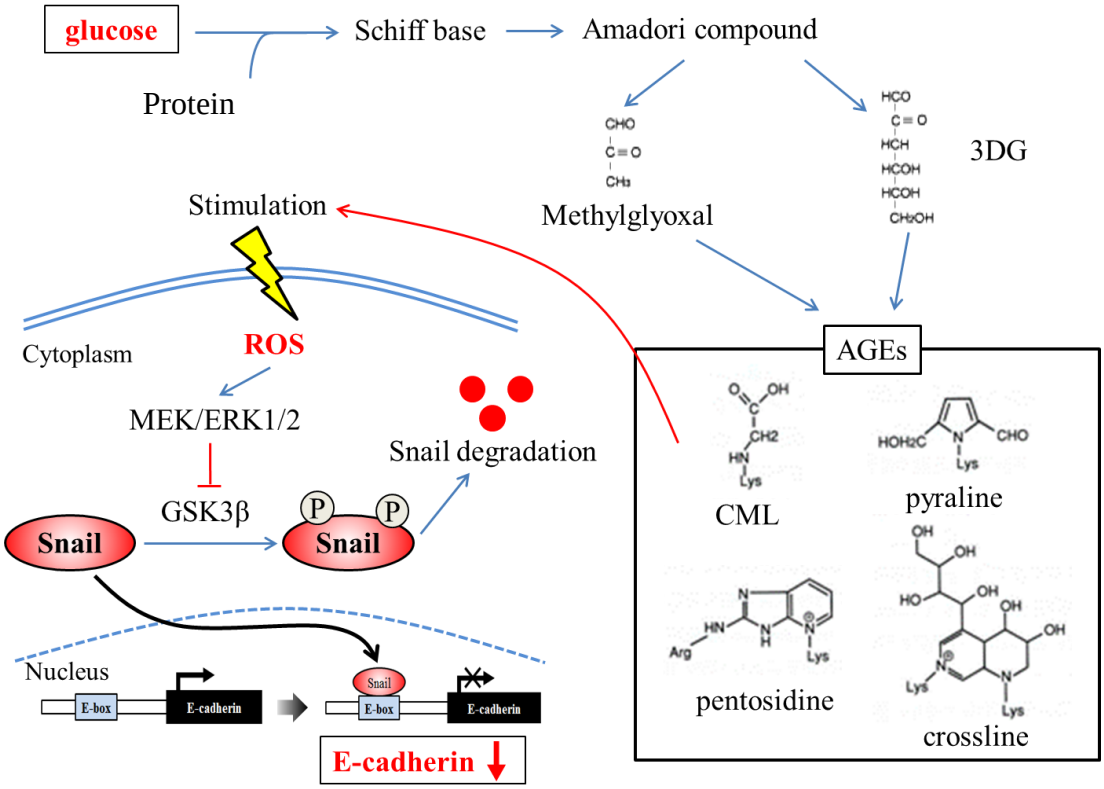


Fig.5-3 生体内における主なメイラード反応および AGE を経た
E-cadherin 抑制メカニズム[50][51]

5-2. TGF-β1 が細胞間結合へ及ぼす影響

EMT が生じる原因の 1 つとして、腹膜透析液による TGF-β1 の産生が挙げられる。これは先ほどの Fig.5-2 にて示した通りである。4.結果において、PDE-HPMC 中には細胞間結合の消失した細胞の混在が示唆された結果を紹介したが、果たしてその細胞のみが混在しているのかを TGF-β1 を添加し、TER 測定値の経時的変化を測定することで解明しようと試みた。

TGF-β1 が細胞間結合の消失させる、すなわち EMT 誘導因子であることを 1-3-1 にて紹介した。この TGF-β1 を、十分に細胞間結合の発達した中皮細胞層に対して添加したところ、OM-HPMC の減少値は 13±2Ω･cm^2、PDE-HPMC の減少値は 6±2Ω･cm^2 であり、その両者の減少値の差は約 7Ω･cm^2 であった(Table.5-1)。一方、MSC でも同様の実験を行ったが、TGF-β1 を添加しても TER 値に変化は無かったため、MSC は細胞間結合を持たない細胞と判定した。これより、次の仮説を立てて考察を行った。

● 仮説①…TER 測定は細胞間結合の有無のみを反映する測定法である

仮説①が成り立つとすれば、TGF-β1 の影響を受け、MSC の抵抗値と同等にまで TER 値が減少した PDE-HPMC の減少値(約 6Ω･cm²)は、TGF-β1 により細胞間結合が消失した細胞を定量化した数値と言える。逆に、大網から採取した HPMC は細胞間結合が無傷形成されているため[52]、その抵抗値(32±1Ω･cm²)から PDE-HPMC の TER 値(17±3Ω･cm²)を引いた値(約 15Ω･cm²)が、細胞間結合を維持した細胞の数値といえる。以下に概要図を記載した(Fig.5-4)。

以上の考察から、PDE-HPMC 中の細胞間結合が消失している、すなわち EMT を惹起した細胞の割合は、以下の式より求められると考えられる。

$$\frac{\text{細胞間結合が消失した細胞の抵抗値}}{\text{細胞間結合を維持した細胞の抵抗値} + \text{消失した細胞の抵抗値}} \times 100 = \mathbf{65.2\%}$$

Table.5-1 TER 値のまとめ

	TER 値(Ω･cm²)		
	TGF-β1 添加前	TGF-β1 添加後	⊿TER(前－後)
OM-HPMC(n=3)	32±1	20±0.4	**13±2**
PDE-HPMC(n=4)	17±3	11±2	**6±2**
MSC(n=5)	9±3	11±2	**-2±1**

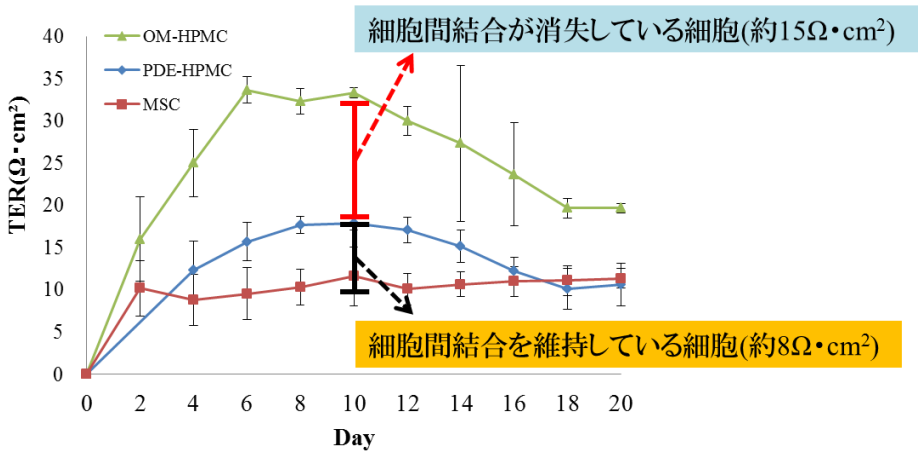


Fig.5-4 細胞間結合定量化の概要図

しかし、本研究結果から α-SMA の陽性率は約 30%と示されたため、65.2%は少々高い割合を示している。それに加え、TGF-β1 添加後の TER 値が OM-HPMC と PDE-HPMC の両者で約 10Ω･cm² の差が生じていることから、もう一つの仮説を立て、考察を行った。

● 仮説②…TER 測定は細胞の厚さも影響する測定法である

一般的に、腹膜構造は腹壁内側の壁側腹膜(parietal peritoneum)と、臓器表面の臓側腹膜(visceral peritoneum)の 2 種から構成されており、両者は互いに連続している(Fig.5-5)。過去の研究において用いられた OM-HPMC は、腹腔内手術から得られたヒト大網塊を親指大の切片に切り分けたものから採取した。すなわち臓側腹膜のみから得られた腹膜中皮細胞であるため、OM-HPMC は臓側由来 HPMC である。一方で PDE-HPMC は腹膜透析液が接する全ての腹腔表面から由来することから、臓側・壁側両者から由来すると考えられる。

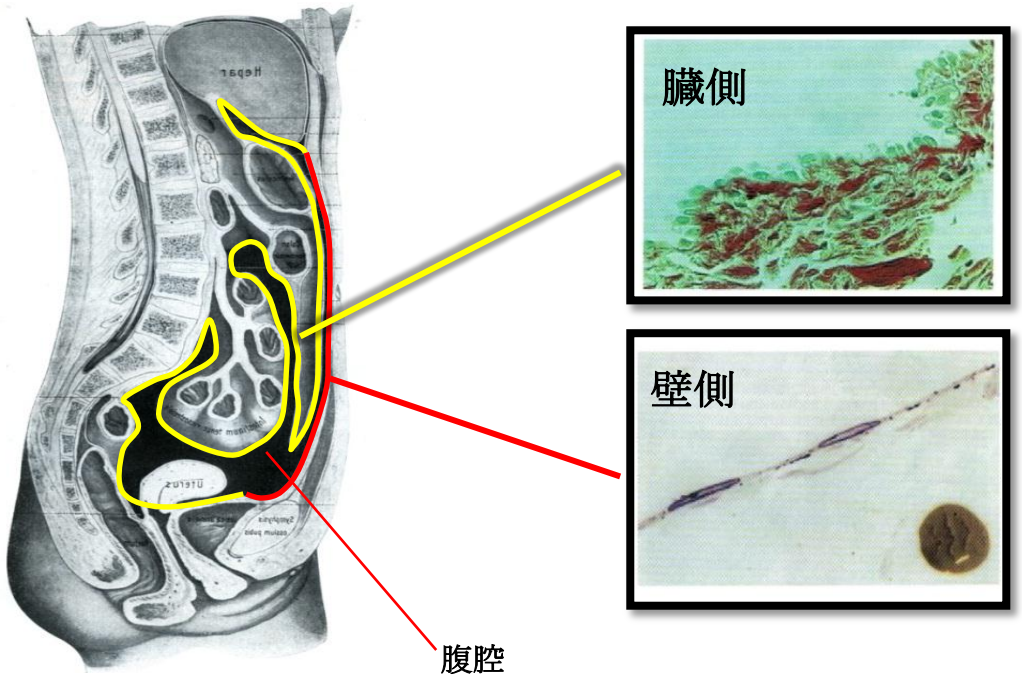


Fig.5-5 臓側腹膜(上)と壁側腹膜(下)の組織図[53]

さらに、TER 測定の原理からすると、細胞間結合タンパク質の有無だけではなく、仮説②のような細胞の厚さも影響すると考えられる。一般的に壁側腹膜は臓側腹膜と比較して扁平構造となっており、電流が流れる流路長が短くなることで、電気抵抗値が減少すると考えられる(Fig.5-6)。

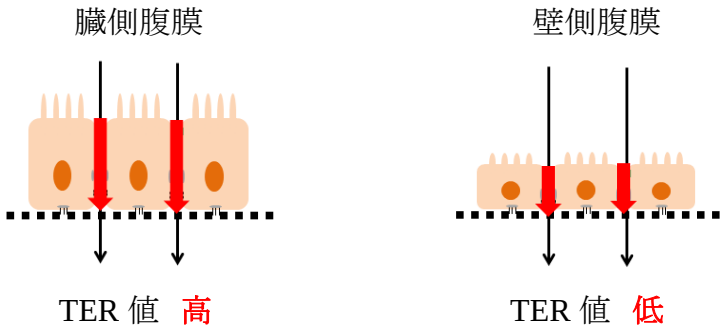


Fig.5-6 臓側・壁側由来 HPMC の細胞間結合へ流れる電流の概略図

以上の考察を踏まえ、PDE-HPMC 中には臓側腹膜および壁側腹膜の両側から脱離した HPMC が混在している可能性が強く伺えた。従って、臓側腹膜由来 HPMC と壁側腹膜由来 HPMC の分離が重要であり、本研究室にて行っている Percoll を用いた密度勾配遠心法が有用と考えている。Percoll は分離対象の細胞と同じ浸透圧に調節ができ、粘度が低いため低い遠心力で、数分のうちに細胞分離が可能である。実際に本研究室では、細胞密度別に細胞を採取することに成功している(Fig.5-7)[54]。このことを利用し、Fig.5-7 のデータをある細胞密度で 2 群に分け、臓側・壁側由来と同定できれば、各々の中皮細胞の細胞間結合の特徴と大きさを定めることが可能となる。

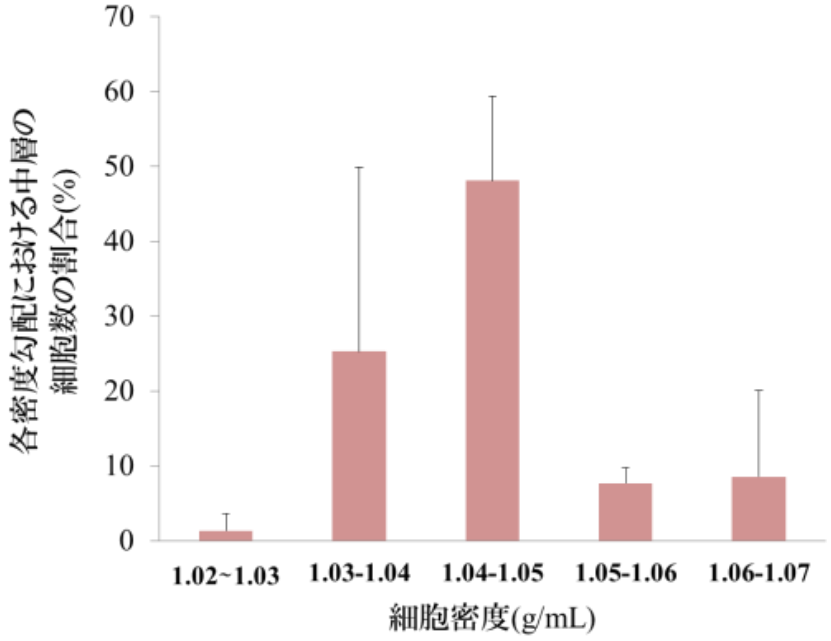


Fig.5-7 細胞密度別に見た細胞含有率(Initial B)[54]

5-3. EMT 誘導させた PDE-HPMC における Cytokeratin-18、E-cadherin、Snail mRNA の変化

PDE-HPMC に対して TGF-β1 を添加した際、E-cadherin mRNA は 24h で顕著な発現量の減少が見られたのに対し、Snail mRNA は 24h、48h と時間依存的に増加し続けた(Fig.4-14、Fig.4-15)。このように、E-cadherin mRNA 発現が TGF-β1 添加直後、急速に減少した原因として、以下の理由が考えられる。

一般的に、E-cadherin は PDE-HPMC の形態形成に重要な役割を果たしており、転写因子である Snail が E-cadherin のプロモーターの E-box に結合することで、その転写を阻害していることが知られている[55]。現在、E-cadherin 抑制シグナルは多数報告されており、Snail や ZEB、E47、KLF8 は E-cadherin のプロモーター領域へと結合して転写阻害を促す因子、Twist や E2.2 は E-cadherin の転写を間接的に抑制する因子であることが知られている (Fig.5-8)[55][56]。すなわち、Snail による E-cadherin 抑制シグナルは、先述のシグナルの内の 1 つにすぎない。従って、E-cadherin の急速な発現量の低下が生じ、Snail の緩やかな増加が観察できたと考えられる。

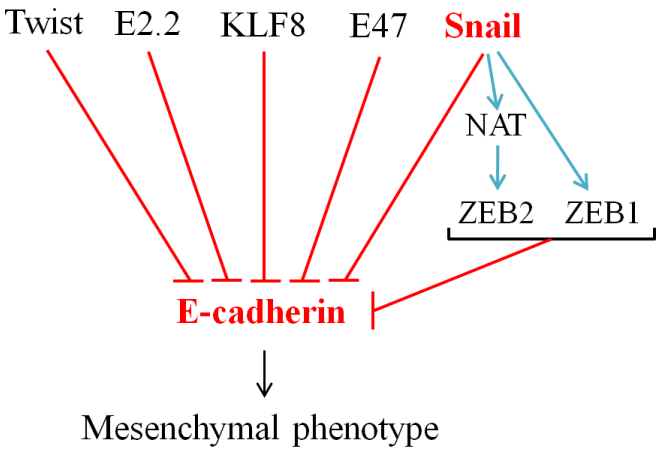


Fig.5-8 E-cadherin の転写阻害図[55][56]

また、研究室の過去の研究により 10ng/mL TGF-β1 を OM-HPMC に添加したところ、誘導後 12h では殆ど変化は見られず、48h で初めて有意な差が生じている[57]。この結果に対して、PDE-HPMC は 24h 時間後に急激な E-cadherin mRNA 発現の減少が見られた(Fig.5-9)。この OM-HPMC と PDE-HPMC の結果から、PDE-HPMC の細胞間結合は非常に EMT を受けやすい状態であると仮定でき、僅かな刺激でも傷害を受けやすい状態になっていると考えられる。

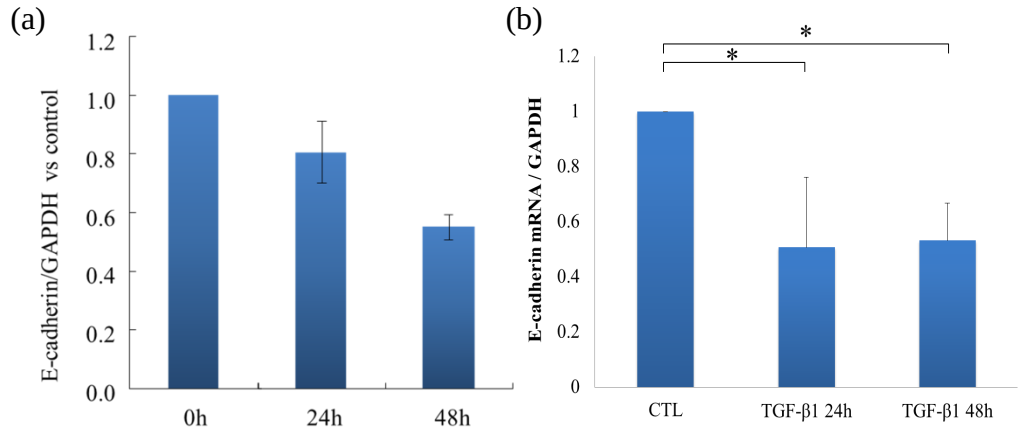


Fig.5-9 TGF-β1 誘導した(a)OM-HPMC と(b)PDE-HPMC の
E-cadherin mRNA 発現変化の比較[57]

また、Snail に関しても同様の考察を行うことが可能である。Fig.5-10(a)において、TGF-β1 添加を OM-HPMC に添加した際の、Snail mRNA 発現の経時的変化を示した。誘導時間が増加するにつれ、mRNA 発現量は増加しているが、12h 後からはほぼ値に変化は見られず、プラトーな状態を保った。これに対し、PDE-HPMC においては 12h、48h と TGF-β1 誘導時間が増加するにつれ、Snail mRNA 発現量も 2 倍、3 倍と増加を続けて、時間依存であることが示されている。

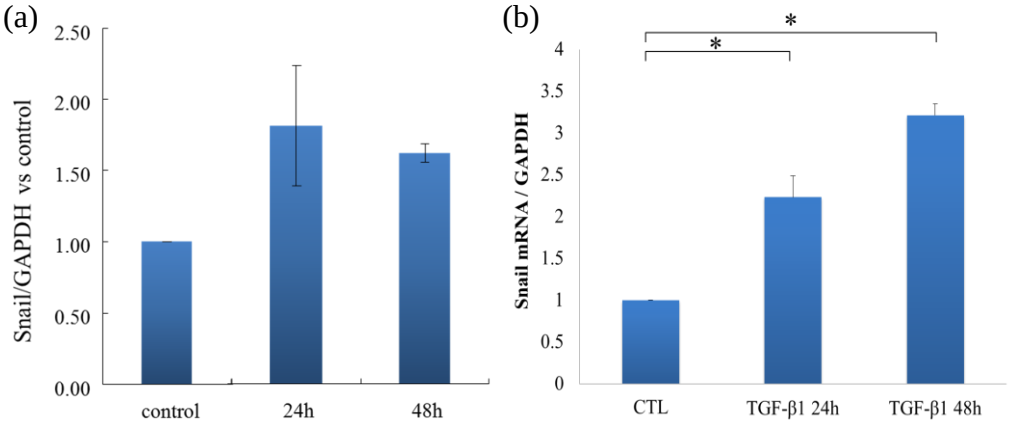


Fig.5-10 TGF-β1 誘導した(a)OM-HPMC と(b)PDE-HPMC の
Snail mRNA 発現変化の比較[57]

以上のように、OM-HPMC よりも PDE-HPMC の方が E-cadherin、Snail mRNA 発現量の増減が顕著である原因として、以下の理由が考えられる。

✓ ROS 蓄積によるシグナル相乗効果

考察 5-1 でも述べたが、腹膜透析液には浸透圧勾配を作り出すため高濃度の Glucose を含有している。この高濃度 glucose により、TGF-β1 や AGE が産出されるという報告が既に存在しており[28][58]、排液中から採取した細胞はすでに TGF-β1 や AGE の影響を大きく受けていることが予想される(Fig.5-2、Fig.5-3 参照)。産生された TGF-β1 のシグナル伝達経路により、Smad を経由して Snail、Slug の mRNA を発現させることで E-cadherin の抑制を促すことが知られている[15][59][60]。このシグナル経路に加え、高濃度 Glucose による AGE 産生により、ミトコンドリアにおける膜電位の低下が生じ、細胞内に ROS の蓄積が起こる[57]。その後、GSK-3β を抑制することで、β-catenin の増加および Snail の mRNA 減少を促し、E-cadherin の抑制へと繋がる[61][62]。

以上の報告から、PDE-HPMC に対してさらに TGF-β1(10ng/mL)を添加した際、通常の TGF-β1 のシグナル経路に加え、蓄積した ROS によるシグナル経路も作動し、両者の相乗効果により E-cadherin および Snail の顕著な mRNA の変化が得られたと考えられる。つまり PDE-HPMC は、すでに TGF-β1 や AGE による影響を受け、脆弱な状態であることが示唆された。

5-4. BMP-7 の MET 誘導因子としての妥当性

EMT が可逆的であるということから、BMP-7 を EMT が起きた細胞へ作用させると MET という現象が起こり、正常な中皮細胞へと可逆的形質変換することが報告されている[32][63][64]。BMP-7 はもともと軟骨や骨で最も発現がみられ、軟骨、骨形成の制御因子として同定された分子量約 36kDa のホモ二量体のタンパク質であり、また TGF-β スーパーファミリーの一員である(Fig.5-11)。しかし成長、分化、走化性、アポトーシスの制御をし、上皮、間葉、造血、神経など様々な細胞に働くことがわかってきた。TGF-β1 が体中の至る所に存在し、それらの組織にレセプターが存在していることからも想像できるように、BMP においても骨のみならず、脳、腎、心臓、皮膚、その他の組織にも発現していることが知られている[65][66]。

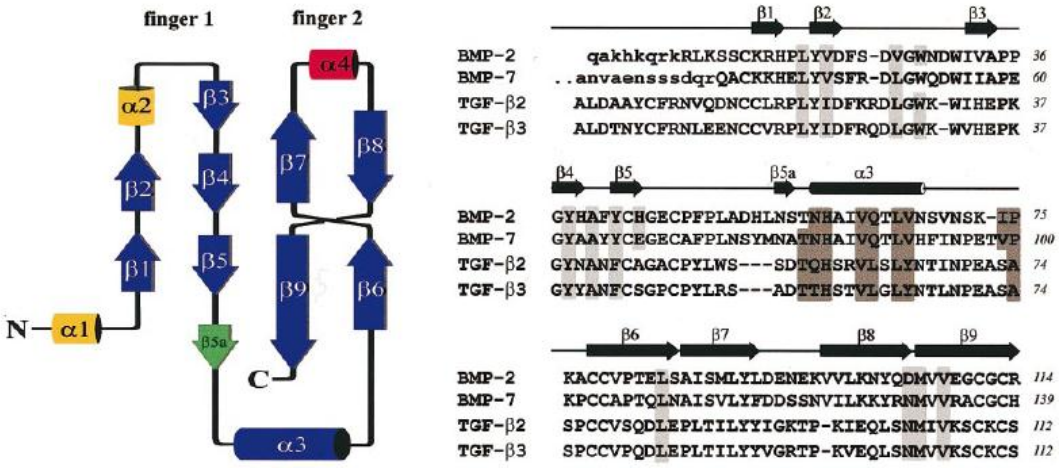


Fig.5-11 BMP-7 の構造

過去のデータから、OM-HPMC に対して BMP-7 添加した際の細胞形態変化はみられなかったが、BMP-7 を添加した際の α-SMA を Western Blotting により定量化したところ、CTL と同等の値を示したため、MET 誘導因子としての効果が認められた[67]。そこで今回我々は、BMP-7 を用いて、PDE-HPMC はもともと EMT を惹起した細胞が混在しているのか、そして TGF-β1 添加した際に、細胞間結合に変化が生じるかどうかを検証した。その結果、PDE-HPMC に BMP-7 を添加したが、細胞間結合に関与する E-cadherin や、細胞骨格である Cytokeratin-18、更には E-cadherin 減少に関する転写因子 Snail に有意な差は生じなかった。しかし、BMP-7 を 24h 添加した後に TGF-β1 を 24h 添加した実験においては、E-cadherin に関して、CTL 程ではないが、TGF-β1 のみを 24h 添加した際の mRNA 発現量より高い結果となった。これは BMP-7 が、MET 誘導因子というよりもむしろ、TGF-β1 による影響を和らげる役割を持つことが確認された。

BMP-7 の TGF-β1 抑制シグナルとして現在考えられているのは、BMP-7 がレセプターを介し、特異的 Smad1/5/8 をリン酸化することによる TGF-β1 の Smad 2/3 と Smad 4 との複合体産生の阻害である(Fig.5-12)[68]。これらの事から、BMP-7 を加えることで細胞内のリン酸化 Smad 1/5/8 が増加し、やがて TGF-β1 により産生される Smad 2/3 と Smad 4 との複合体の形成を抑制したためと考えている。しかし、BMP-7 を添加した際の形質は、紡錘状から玉石状へ変化しなかったことから(not shown)[67]、さらなるメカニズムの精査が不可欠であると認識した。

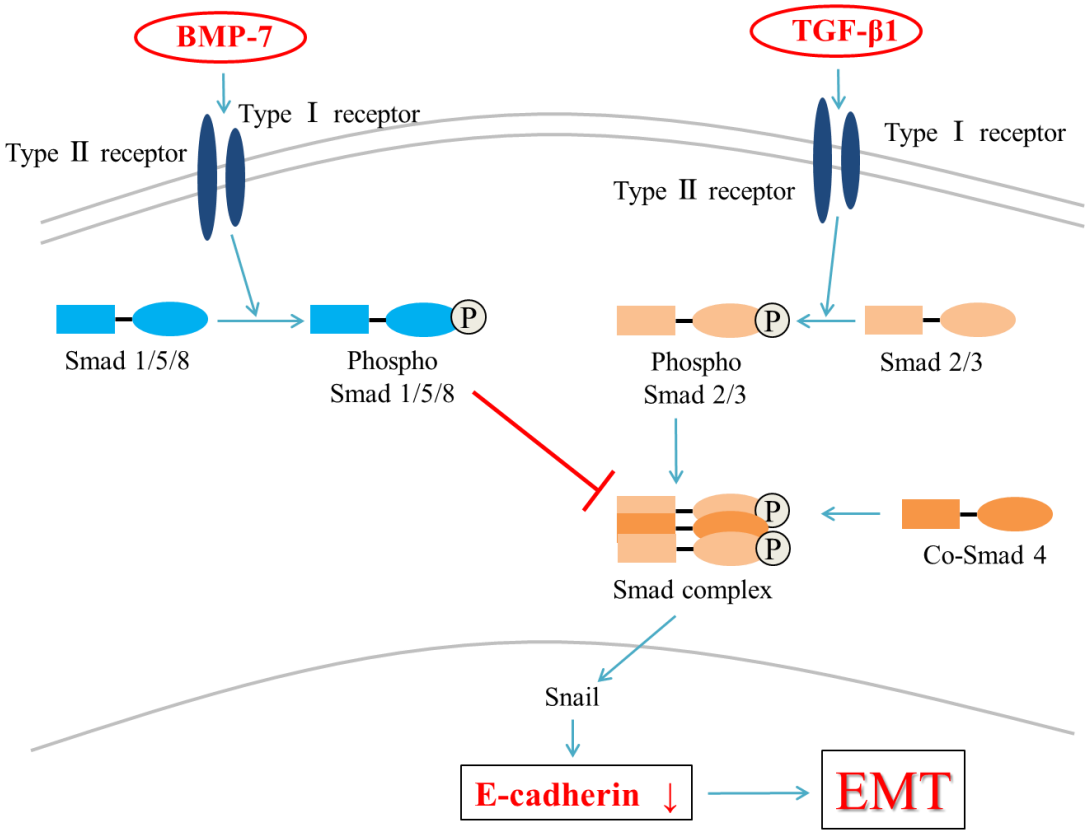


Fig.5-12 BMP-7 による TGF-β1 抑制メカニズム[68]

5-5. 二次元電気泳動によるタンパク質変化

二次元電気泳動とは、一段階目で等電点電気泳動によりタンパク質を等電点で分離し、二段階目で SDS-PAGE により分子量で分離を行う方法である。サンプル間のタンパク質発現量の差の検出を目的として行われ、発生過程におけるタンパク質発現の変化や、新規薬剤の作製・効果の評価など様々な分野におい用されている。今回の実験により、CTL と TGF-β1 添加モデルとの比較、また TER 値の低い患者と高い患者との比較において、比較的多くのタンパク発現量の違いが見られたため、これについて考察を行う。

現在多くのプロテオーム解析が行われており、その二次元電気泳動の殆どが TOF-MS(Time Of Flight Mass Spectrometry; 飛行時間型質量分析法)を用いた高性能タンパク分析法を用いて解析されている。本研究においてはゲルの比較によるタンパク質の比較のみを行ったため、プロテオーム解析を行った様々な文献を基に解析していく。その上で、本研究と関連するであろう 4 つのタンパク質の MW(kD)と等電点(pI)を記載した(Table.5-2) [69][70][71]。

Table.5-2 タンパク質の分子量および等電点

	Molecular Weight(kD)	pI
β-actin[69]	41.7	5.3
Cytokeratin-18[69]	47.9	5.3
E-cadherin[70]	91.19	4.5
Vimentin[71]	53.7	5.1

5-5-1. CTL vs. TGF-β1 添加モデル

重ね合わせた画像(Merge)によると、細胞に一定量発現している β-actin は、同じ露光時間であるため両者とも一定量発現していた(Fig.5-13①)。また、中皮細胞マーカーである Cytokeratin-18 のスポットでは、若干 CTL の方が強発現していることが示され、TGF-β1 添加により Cytokeratin-18 の発現量の減少が示唆された(Fig.5-13②)。また、③の細胞間結合タンパク質 E-cadherin は、本研究にて行った RT-PCR の結果と非常に関連性が強い。しかし、両者で発現量の変化は見られず、本研究における RT-PCR による結果と相反する結果となった。この原因として、タンパクの変性等により異なる等電点にて発現してしまっている可能性があるため、同スポットは TOF-MS を用いて分析し、どのようなタンパク質かを同定することが今後必須となる。さらに、Vimentin は間葉系細胞の細胞骨格として有名であり、間葉系マーカーとして用いられている[33]。この Vimentin に関するスポットは、MW と pI から④のスポットと推測できる。拡大図においては、TGF-β1 添加モデル(緑)の方が強発

現しているため、TGF-β1 添加により EMT が生じていることが伺える。一方で、唯一明らかに発現量の異なるタンパク質も見られた(Fig.5-13、黄枠)。これらのタンパク質は、TOF-MS を行っていないため断定はできないが、このような明らかに発現量が異なるタンパク質を追究していくことで、プロテオーム解析を利用した新規腹膜機能診断法の確立が期待される。

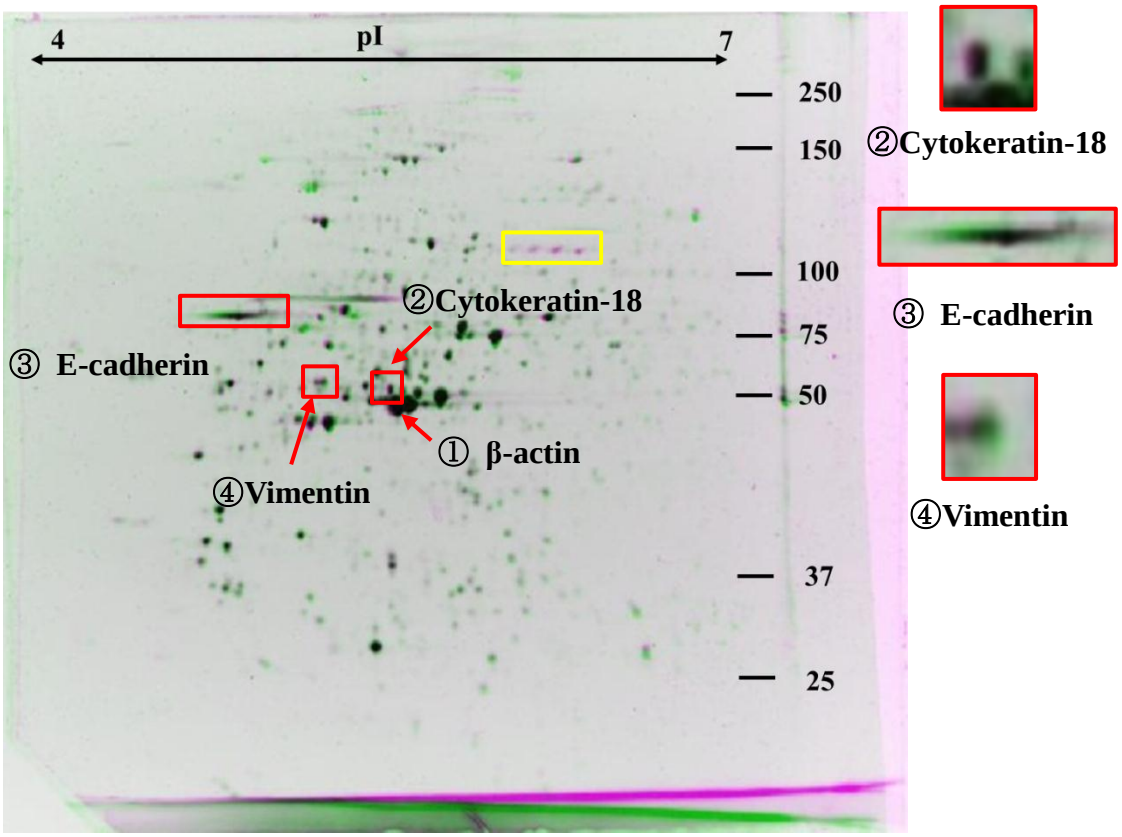


Fig.5-13 CTL と TGF-β1 添加モデルの Merge 画像

5-5-2. TER 測定値　高い患者 vs.低い患者

両患者間で、タンパク質発現スポットの強弱が多く見られた(Fig.5-14)。その中でも E-cadherin に関連するスポットは、①のスポットであると考えられ[70]、今回の結果から H-Pt(赤)の方が強発現していることが分かる(Fig.5-14 画像拡大図①)。また、(A)や(B)のようなタンパク質のように、H-Pt および L-Pt でタンパク質発現に強弱のあるタンパク質も存在している。

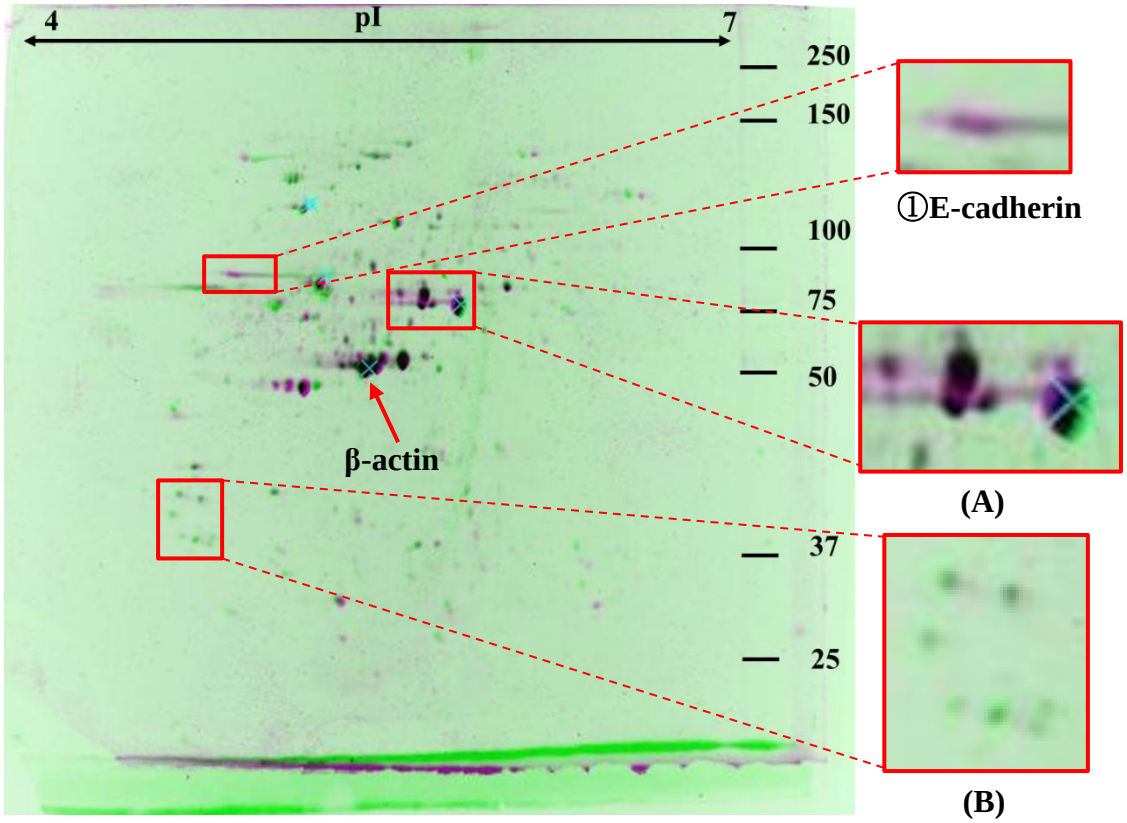


Fig.5-14 TER 値の H-Pt vs. L-Pt

二次元電気泳動により得られたスポットが、どのようなタンパク質でどのようなアミノ配列をしているのかを解析する MALDI-TOFMS (Time Of Flight Mass Spectrometry; 飛行時間型質量分析法)は、作成したアクリルアミドゲルからのタンパクスポットの切り出し、ジスルフィド結合を開裂する還元アルキル化処理、プロテアーゼ処理、脱塩操作を行うことにより、より一層確かなタンパク質の変動を把握でき、高分解能・高選択的微量分析が可能である。これにより、腹膜に炎症のある患者の PDE-HPMC をプロテオーム解析し、異常タンパクが発現するかどうかなどタンパク質の増減を観察することによって、様々な診断法への応用が可能となる。そのため本研究においても、TOF-MS を用いた PDE-HPMC のプロテオーム解析が必須となり、異常タンパク質マーカーをいち早く探索することが重要である。

5-6. 臨床的意義との関連性

腹膜透析療法は、長期間の使用による合併症が懸念されている。というのも、長期間の透析液使用により、腹膜中皮細胞が炎症を受け、腹膜機能の低下を示唆する報告が多数存在する。本研究結果においても、患者の臨床データ(年齢およびCAPD 期間)とPDE-HPMC が持つ細胞機能との間に比較的高い相関性が得られている(Fig.5-15、Fig.5-16)。

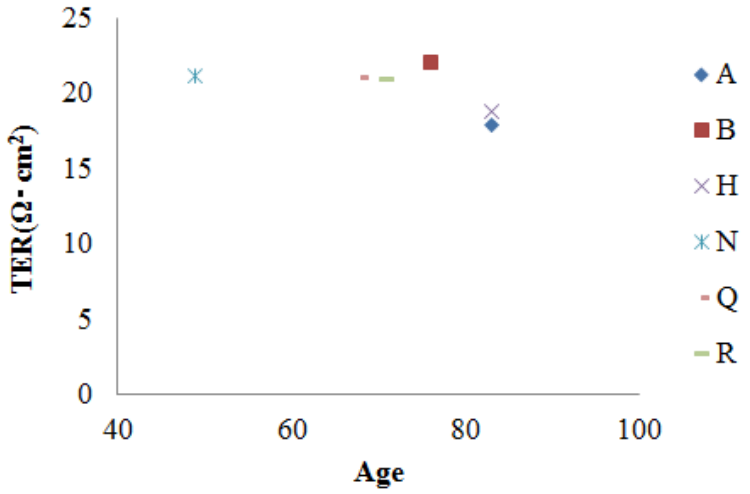


Fig.5-15 年齢 vs. TER 測定

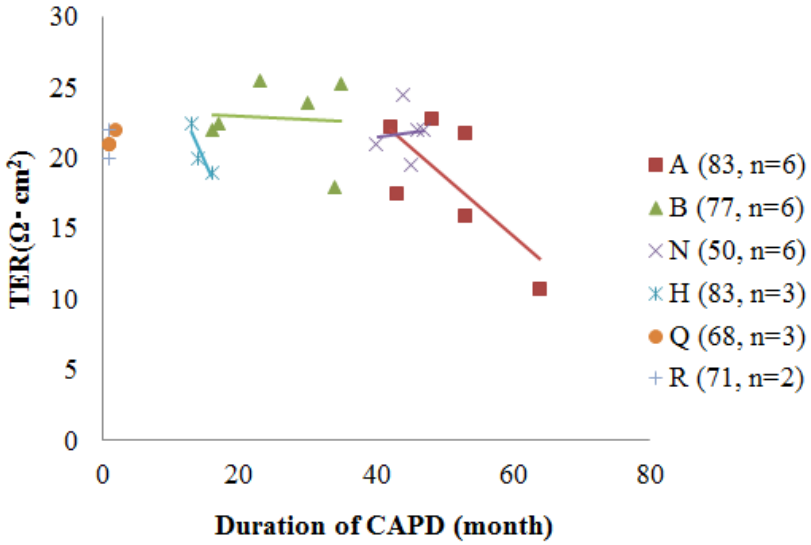


Fig.5-16 CAPD 期間 vs. TER 測定

今回の臨床データとの比較により、細胞間結合形成能と年齢および CAPD 期間との間に逆相関が見られたことから分かるように、年齢と CAPD 期間の増加に伴い細胞間結合形成能の低下が亢進し、腹膜において中皮細胞単層の物質透過制御能が著しく低下すると考えられる。透析液内の Glucose が体内へと容易に移動し、濃度勾配形成が短時間しかできず、除水不足や老廃物の除去不足に繋がる。そのため、細胞間結合形成能と除水能あるいは 1-1-4 にも挙げた Cr の D/P 比などでも相関関係が得られるものと考えられる。

また、TER 測定により PDE-HPMC は、臓側腹膜と壁側腹膜両側から剥離した細胞の混在であることが示唆された。今後はこの臓側腹膜と壁側腹膜の混合割合などを知るマーカーを模索することで、どの部位で腹膜傷害が生じ、合併症へ繋がる危険があるかを知る手掛かりになると考えられる。

最後に、免疫蛍光染色による α-SMA 発現は、腹膜中皮細胞における EMT 亢進具合を把握する 1 つのツールであると考えられる。このことから、タンパク質の発現量を経時的に定量化し、α-SMA などのタンパク陽性率の変化を追うことで、PD 中止判断基準の信頼性拡大へと繋がることが期待される。

本研究において特に注目すべき点は、腹膜透析排液を用いた細胞機能診断法は無侵襲診断法であり、これまでの既存の診断法と組み合わせることでより一層確実性を増した腹膜診断法を確立できる事にある。今回の実験結果からも得られたように、経時的に患者の細胞機能に関するデータを得ることで、何らかの相関性が得られた。今後も継続的に細胞機能と患者の臨床データとの関係性を追究していくことで、新たな無侵襲診断法の確立に貢献できると確信している。

6. 結論

本研究結果により、以下の事が導き出された。

✓ **PDE-HPMC 中には以下の細胞の混在が示された。**

① 細胞間結合が損失し、EMT を惹起している細胞

② 臓側腹膜、壁側腹膜から離脱した正常な細胞

これらの細胞が腹膜透析排液由来 HPMC 中に存在し、それぞれの細胞群の割合によって腹膜状態の変化が反映される事が考えられる。

✓ **TER 測定は腹膜機能を測定する客観的測定法となりうる。**

患者毎に TER 測定を行った結果、患者毎に抵抗値に差が出ていることがわかる。このことから、継時的に PDE-HPMC の TER 測定値を測定することで、PD 中止判断基準への無侵襲診断法の応用が期待できる。

✓ **CAPD 期間と TER 値の逆相関性**

患者の臨床データである年齢および CAPD 期間が、TER 値と逆相関という関係性を持ったことから、年齢および CAPD 期間の増加に伴って細胞間結合形成能の減少が示された。

また、急激に TER 値が減少する患者も見られたため、ある一定の CAPD 期間を過ぎると TER 値が急激に減少、すなわち細胞間結合を失った細胞の混在が増加する事が示唆された。

✓ **MET 誘導因子としての妥当性 BMP-7**

BMP-7 は今回の研究において、既存の文献で多数報告されている MET 誘導因子としての効果はほとんど示されなかったが、TGF-β1 による EMT 誘導を抑制する役割を持つことが示され、EMT 抑制因子としての効果を持つことが示された。

✓ **二次元電気泳動が腹膜機能診断の手段の一つとなりうる。**

本研究の二次元電気泳動において、CTL vs. TGF-β1 および H-Pt vs. L-Pt によるタンパク質の比較を行ったところ、両サンプル間での明瞭なタンパク発現量の違いが示された。特に後者の間ではタンパク質発現量の強弱が著しくみられたため、このようなタンパク質の違いを利用し、腹膜機能診断法へ応用できる可能性が示唆された。

7. 今後の展望

- **細胞間結合タンパク質の局在**

本研究において、①OM-HPMC と比較し、PDE-HPMC の TER 値が 34%低い値を示した事、②TGF-β1 により TER 値が減少し、MSC と同等の値へと変化した事③TGF-β1 の影響により、E-cadherin mRNA 発現量の減少、および Snail mRNA の時間依存的増加をうけ、PDE-HPMC の細胞間結合の特性が明らかとなってきた。しかしながら、細胞間結合は他にも多数存在しており、Occludin や Claudin、ZO-1 などの発現量の変化も調査することで、より信憑性のあるデータとなることが期待される。また、今後は mRNA レベルでの確認ではなく、タンパクレベルでの増減を追究していくことで、PDE-HPMC の細胞間結合状態を把握することが可能となり、HPMC の脱離メカニズムの解明にもつながると考えられる。

- **臓側腹膜および壁側腹膜のマーカーの探索**

今回の TGF-β1 添加により PDE-HPMC の TER 値経時的変化により、臓側・壁側腹膜両側からの細胞の脱離が示唆されたが、これらの細胞マーカーを探索することで、患者のどの腹膜部位が障害を負っているかを診断する手段の 1 つと成り得る可能性が示唆された。その診断法の確立ためには、本実験にて行った二次元電気泳動に加え、TOF-MS を駆使したプロテオーム解析を取り入れることでより一層高度なタンパク質解析を行っていく必要性がある。

- **腹膜機能を診断する無侵襲診断法としての確立**

今回の研究結果により、患者毎の細胞機能の違いや、臨床データとの相関関係が得られたことから、既存の中皮細胞診に加え、細胞機能を用いた新規腹膜機能診断法の確立へ一歩近づいた。これらのデータを臨床現場にて利用するためには、新たなマーカーによる診断基準の開発や、同患者での長期間のデータ集積を行う必要がある。今後も継続して本研究における細胞機能評価および患者の臨床データとの関係を精査することで、無侵襲診断法の確立を目指す。

8. 参考文献

1. 平原　一郎 ： 中皮細胞の epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)による腹膜肥厚の促進/東京医学社　2007
2. Betjes MGH, *et al*: The Mesothelial Cells in CAPD Effluent and Their Relation to Peritoneal Incidence. *Peritoneal Dialysis International*, 1991; 11: 22-26
3. McLaughlin S, *et al*: Laparoscopic diagnosis of abdominal tuberculosis. *Aust NZJ Surg*, 1998; 68: 599-601
4. Pombo F, *et al*: CT-guided core-needle biopsy in omental pathology. *Acta Radiol*, 1997; 38: 978-81
5. Mizunoe S, *et al*: A case of tuberculous peritonitis diagnosed by ultrasonography-guide peritoneal biopsy. *J.J.A.Inf.D*, 2000; 74: 589-93
6. 川口　良人 ： 腹膜透析入門/東京医学社　2008
7. Hirahara I, *et al*: The potential of matrix metalloproteinase-2 as a marker of peritoneal injury, increased solute transport, or progression to encapsulating peritoneal sclerosis during peritoneal dialysis-a multicenter study in Japan. *Nephrol Dial Transplant*, 2007; 22: 560-67
8. Watanabe S, *et al*: Correlation between interleukin-6 in dialysate and indices of the peritoneal equilibration test. *Journal of Japanese Society for Dialysis Therapy*, 1999; 32: 267-70
9. Lopez-Cabrera M, *et al*: Ex vivo analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int*, 2006; 26: 26-34
10. Jimenez-Hefferman J.A, *et al*: Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch*, 2004; 444: 247-256
11. Yanez-Mo M, *et al*: Petoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells. *N Engl J Med*, 2003; 348: 403-13
12. Selgas R, *et al*: Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell – its role in the response of the peritoneum to dialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 2006; 21: ii2-ii7
13. 山口　陽平　著: Snail mRNAとEpithelial to Mesenchymal Transition (EMT). 平成18年度　三重大学工学部分子素材工学科卒業論文　2006
14. Maszi A, *et al*: Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003; 284: F911-F924

15. Tian Y.C, *et al*: Epithelial growth factor and transforming growth factor-beta 1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Exp Cell Res*, 2007; 313: 2367-77
16. Zeisberg M, *et al*: The role of epithelial to mesenchymal transition in renal fibrosis, *J Mol Med*, 2004; 82: 175-81
17. Zeisberg M, *et al*: BMP-7 counteracts TGF-beta1- induced epithelial-to -mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*, 2003; 9: 964-68
18. Kudo Y, *et al*: Invation and Metastasis of Oral Cancer Cells Require Methylation of E-cadherin and/or Degradation of Membranous β-Catenin. *Clinical Cancer Research*, 2004; 10: 5455-63
19. Maszi A, *et al*: Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003, 284: F911-F924
20. Hirahara I, *et al*: Methylglyoxal induces peritoneal thickening by mesenchymal-like mesothelial cells in rats. *NDT*, 2008; 10: 1093
21. Luiz S. Aroeira, *et al*: Epithelial to Mesenchymal Transition and Peritoneal Membrane Failure in Peritoneal Dialysis Patients: Pathologic Significance and Potential Therapeutic Interventions. *J Am Soc Nephrol*, 2007; 18: 2004-13
22. Oldfield M.D, *et al*: Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest*, 2001; 108: 1853-63
23. An S. De Vriese, *et al*: Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia. *Nephrol Dial Transplant*, 2006; 21: 2549-55
24. An Hang Yang, *et al*: Myofibroblastic conversiton of mesothelial cells. *Kidney Int*, 2003; 63: 1530-39
25. Fan J.M, *et al*: Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism in vitro. *Am J Kidney Dis*, 2001; 37: 820-31
26. Weidner K, *et al*: Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 7001-5
27. Mei-Jen, *et al*: Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci*, 2008; 99: 905-13

28. Ha H, *et al*: High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 2001; 59: 463-70
29. Offner F.A, *et al*: Transforming growth factor-beta synthesis by human peritoneal mesothelial cells. Induction by interleukin-1. *Am J Pathol*, 1996; 148: 1679-88
30. Jean Paul Thiery, *et al*: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2006; 7: 131-42
31. Min-A Yu, *et al*: HGF and BMP-7 Ameliorate High Glucose-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Peritoneal Mesothelium. *J Am Soc Nephrol*, 2009; 20: 567-81
32. Paul L. Dudas, *et al*: BMP-7 fails to attenuate TGF-β1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubule epithelial cells. Nephrol Dial Transplant, 2009; 24: 1406-16
33. Tanaka M, *et al*: Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP antagonist) in kidney development and injury. *Kidney International*, 2008; 73: 181-91
34. Stephen D, *et al*: Thiols stabilize cobblestone morphology of cultured mesothelial cells. *Cell Biology International*, 2011; 35: 857-67
35. Nakatani T, *et al*: Enhancement of thioredoxin/gluteredoxin-mediated L-cysteine synthesis from S-sulfocysteine increases L-cysteine production in *Escherichia coli*. *Cell Fact*, 2012; 11: 62
36. Ito T, *et al*: Effect of Glucose on Intercellular Junctions of Cultured Human Peritoneal Mesothelial Cells. *J Am Soc Nephrol*, 2000; 11: 1969-79
37. Gemma. F, *et al*: Occludin : Structure, junction and regulation, Advanced Drug Delivery Reviews. 2005; 57 883-917
38. 文部科学省HPターゲットタンパク研究プログラム: http://www.tanpaku.org/tp_fundamental_biology/07.php
39. 津留 慎吾 著: 細胞の足場材料と細胞間結合についての基礎的研究. 平成20年度 三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文 2008
40. Inagi R, *et al*: Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Letters*, 1999; 463: 260-64
41. Stanislava Merjava, *et al*: Cytokeratin 8 and 18 in adult corneal endothelium. *Experimental Eye Reserch*, 2009; 89: 426-31

42. Jing-Xin Ding, *et al*: The reinforcement of invasion in epithelial ovarian cancer cells by 17β-Estradiol is associated with up-regulation of Snail. *Gynecol Onc*, 2006; 103: 623-30
43. 東 洋 著: 形質変換に伴う細胞極性変化の膜間電気抵抗測定. 平成21年度 三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文 2009
44. Leung J. C, *et al*: Glucose degradation products downregulate ZO-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF. *Nephrol Dial Transplant*, 2005; 20: 1336-49
45. Yano T, *et al*: Phosphorylation of keratin intermediate filaments by protein kinase C, by calmodulin-dependent protein kinase and by CAMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem*, 1991; 197: 281-90
46. Omary MB, *et al*: PKCE-Related Kinase Associates with and Phosphorylates Cytokeratin 8 and 18. *The Journal of Cell Biology*, 1992; 117: 583-93
47. Bhowmick NA, *et al*: Transforming Growth Factor-β1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. *Mol Biol Cell*. 2001; 12: 27-36
48. Fan L, *et al*: Cell Contact-dependent Regulation of Epithelial-Myofibroblast Transition via the Rho-Rho Kinase-Phospho-Myosin Pathway. *Mol Biol Cell*. 2007; 18(3): 1083-97
49. Yamaguchi Y, *et al*: Three-dimensional invasion of epithelial-mesenchymal transition-positive human peritoneal mesothelial cells into collagen gel is promoted by the concentration gradient of fibronectin. *Perito Dial Int* 2011; 31(4): 477-85
50. Jean Paul Thiery, *et al*: Epithelial-Mesenchymal Transition in Development and Disease. *Cell*, 2009
51. Eduad Batlle, *et al*: The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology*, 2000; 2: 84-89
52. Takashi Horiuchi, *et al*: HPMCs INDUCE GREATER INTERCELLULAR DELOCALIZATION OF TIGHT JUNCTION-ASSOCIATED PROTEINS DUE TO A HIGHER SUSCEPTIBILITY TO H_2O_2 COMPARED WITH HUVECs. *Perit Dial Int*, 2009; 29: 217-26
53. Atlas of Peritoneal Histology. *Perit Dial Int*, 2000; 20
54. 叢 秀娜 著: 腹膜透析排液由来細胞の分画とキャラクタリゼーション. 平成21年度 三重大学工学部分子素材工学科 卒業論文 2009

55. 山口 陽平 著: フィブロネクチン濃度勾配を駆動力とするコラーゲンゲル内EMT細胞の3次元遊走. 平成20年度 三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文 2008
56. Sun-Mi Park, *et al*: The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *GENES & DEVELOPMENT* , 2008; 22: 894-907
57. Sendurai A. Mani, *et al*: The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 2008; 133: 704-15
58. Vincenza Frisardi, *et al*: Metabolic-cognitive syndrome: A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 2010; 9: 399-417
59. Lorenza Gonzalez-Mariscal, *et al*: Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008; 1778: 729-56
60. Yang-Hee Jang, *et al*: Effects of dexamethasone on the TGF-β1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human peritoneal mesothelial cells. *Laboratory Investigation*, 2013; 93: 194-206
61. Zhou, B. P, *et al*: Dual regulation of Snail by GSK-3b-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2004; 6: 931-40
62. Cadigan KM, *et al*: Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, 1997; 11: 3286-305
63. Regina Vargha, *et al*: Ex vivo reversal of in vivo transdifferentiation in mesothelial cells growth from peritoneal dialysate effluents. *Nephrol Dial Transpl*, 2006; 21: 2943-47
64. Michael Zeisberg, *et al*: BMP-7 counteracts TGF-β1-induced epithelial-to -mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature Medicine*, 2003; 9: 964-968
65. Lyons KM, *et al*: Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic. *Genes Dev*, 1989; 3: 1657-68
66. Lyons KM, *et al*: Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development*, 1990; 109: 833-44
67. 佐野 晃史 著: 腹膜機能維持に関する基礎的研究 ー形質変換と細胞遊走性ー. 平成21年度 三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文 2009

68. Mariette R.Boon, *et al*: Bone morphogenetic protein 7: A broad-spectrum growth factor with multiple target therapeutic potency. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2011; 22: 221-29
69. Ayse Y. Demir, *et al*: Proteome analysis of human mesothelial cells during epithelial to mesenchymal transition induced by shed menstrual effluent. *Proteomics*, 2004; 4: 2608-23
70. Visith Thongboonkerd, *et al*: Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney International*, 2002; 62: 1461-69
71. Jian-Wei Wang, *et al*: Identification of metastasis-associated proteins involved in gallbladder carcinoma metastasis by proteomic analysis and functional exploration of chloride intracellular channel 1. *Cancer Letters*, 2009; 281: 71-81

9. 謝辞

本研究を行うに当たり、丁寧かつ熱心なご指導・ご鞭撻を賜り、公私において非常にお世話になりました三重大学大学院　工学研究科　分子素材工学専攻　生体材料科学研究室の指導教官　堀内　孝教授、宮本　啓一准教授、事務員の村上　節子様に深く感謝いたします。

本研究に際して、必要な腹膜透析排液を快く提供して頂いた三重大学医学部付属病院で治療中の腹膜透析患者様に深く感謝の意を示します。また被験者提供に協力して頂き、合同カンファレンスにて多くのご意見・ご指摘を下さいました血液浄化療法部　石川　英二様、村田　智博様を始め諸先生方、看護師の皆様方へ感謝の意を表します。

3 年間研究室の先輩として熱心に研究に取り組む姿を示し、数多くの助言をいただきました D3　水谷　直紀先輩を始めとする諸先輩方、また研究室生活においてお互いに刺激しあい、励ましあい、共に成長し合った M2　阿部　功児君、神谷　歩君、境　淳志君、田野　裕美さん、中村　雅弘君、丹羽　一喜君に深く感謝致します。

そして、M1　伊藤　直人君、影山　聡志君、小山　直紀君、中町　信敏君、長谷川まりなさん、1 年間という短い期間ではありましたが、塚本　真子さん、北村　早希さん、清水　佑典君、財部　龍太郎君、B4　角谷　直樹君、傍島　達也君、萩原　慎之君、畑　俊宏君、古藏　史子さん、堀江　俊樹君、水田　裕磨君、山田　将義君たちのおかげで毎日の研究室生活が充実したものとなり、楽しく過ごすことができました。深く感謝しますとともに、今後の研究室の発展、および皆さんそれぞれの成長を期待しております。

また、時には厳しく指導した事もありますが、最後まで同じチームとして研究に取り組み、日々共に研究に勤しんだ　M1　叢　秀娜さん、B4　西町　早織さん、山口　直也君には感謝の意が絶えません。

私は生体材料化学研究室において研究だけではなく、数多くの学会発表や国際学会、Cleveland Clinic (Lerner Research Institute)への留学という様々な貴重な経験をさせていただきました。留学という選択肢を築いてくださった堀内　孝教授を始め、東　洋先輩、山本　光則先輩、そして私を支えて下さった皆様に深く感謝申し上げます。今後もこの生体材料化学研究室が、海外へ興味を持ち、国際的に競争力のある学生を輩出できる素晴らしい研究室として発展することを心より願っております。

10. Appendix

A-1. 細胞培養 **Protocol** ····· 68

A-2. 細胞面積測定 ····· 74

A-3. 膜間電気抵抗**(TER)**測定 ····· 75

A-4. 免疫化学蛍光染色法 ····· 77

A-5. AGPC 法 ····· 85

A-6. RNA 定量 ····· 89

A-7. RT-PCR 法 ····· 91

A-8. 二次元電気泳動 ····· 107

A-9. 統計処理 ····· 144

B-1. 滅菌方法 ····· 145

B-2. Primer 表 ····· 146

B-3. RT-PCR プログラム ····· 147

B-4. 本研究で使用した試薬について ····· 148

C-1. 腹膜透析患者まとめ ····· 150

A-1. 細胞培養 Protocol

A-1-1. 培地調整

<使用機器・器具・試薬>

- 50mL シリンジ(TERUMO®)
- 30mL アシストチューブ(アシスト/Cat.No.60.543.001S)
- 注射針
- pH メーター
- Millex-GV(MILLIPORE/Cat.No.SLGV025LS/孔径 0.22μm)
- Strivex GS(MILLIPORE/Cat.No.SVGSB1010/膜孔径 0.22μm)
- STERICUP™ フィルター(MILLIPORE/Cat.No.SCGVU05RE)
- 15mL 遠沈管
- 0.5mL アシストチューブ(アシスト/Cat.No.72.699 S)
- Medium 199(SIGMA/Cat.No.M2154)
- Penicillin streptomycin(SIGMA/Cat.No.P-0781)
- Insulin Transferin Selenate(SIGMA/Cat.No.I-1844)
- L-Glutamine(SIGMA/Cat.No.G-7513)
- Hydrocortisone(SIGMA/Cat.No.H-0888)
- 1N NaOH aq
- 1N HCl aq(080-08065/Wako)
- Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)
- Diethylpyrocarbonate

<各溶液調整>

○ 培地調整

- ITS（Insulin Transferin Selenate）

  ITS（パウダー状）の瓶に DEPC 処理水 50 mL を入れ撹拌し、1.5mL アシストチューブに 500μL ずつ分注し、冷蔵庫にて 4℃で保存した。

- L-G（L-Glutamine）

  15 mL 遠沈管に 5 mL ずつ分注し、冷蔵庫にて 4℃で保存した。

- P-S（Penicillin-Streptomycin Solution）

  5 mL アシストチューブに 5 mL ずつ分注し、冷凍庫にて－20℃で保存した。

- HC（Hydrocortisone）

  HC 4 mg を 2 mL の無水 ethanol で溶解し、DEPC 処理水 2 mL を加え

て濾過した。0.5 mL アシストチューブに 200 µL ずつ分注し、室温で保存した。

[操作]

① L-G、P-S 各 5 mL を一本のチューブにまとめ、L-G,HC をそれぞれ 50 µL ずつ加えた。

② 上記のサプリメントを、10 mL シリンジ（TERUMO®）を用いて Millex-GV を通してフィルター滅菌し、Medium-199 に添加した。

＊pH を調整する場合

③ 培地の pH を調整した。また、pH は 7.2 に調整した。

※体内の pH は 7.4 である。

※pH を 7.2 にするのは、フィルター滅菌後に pH の値がおよそ 0.2 大きくなるためである。1N-HCl aq や 1N-NaOH aq を使用して pH を調整した。

○ Fetal bovine serum（FBS;牛胎児血清）の不活性化、分注、保存

[操作]

① 凍結の状態で送られてきた FBS は 37℃で溶かした。溶かし終わったら数回振り、55～56℃で、時折振り混ぜながら 30 分間温めた（不活性化）。

② 50 mL のシリンジ（TERUMO®）で吸い取り、Strivex GS、もしくは、Stericup フィルターユニットにてフィルター滅菌し、30 mL アシストチューブに 25 mL ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌操作で行った。

③ 冷凍庫（－20℃）で保存した。

○ Trypsin-EDTA solution (10x)

[操作]

① 納品後、冷凍保存（－20℃以下）した。

② 37℃で解凍し、5 mL アシストチューブに 4 mL ずつ分注し、－20℃にて保存した。

○ 滅菌水の作製

[操作]

① Milli-Q 水又は蒸留水（用途に応じて）滅菌瓶に小分けし、高圧蒸気滅菌（121℃、20 分）した。

② 滅菌後、栓をしたまま棚に保管した。

○ DEPC 処理水の作製

[操作]

① メディウムビンを Milli-Q 水で 2 回洗浄し、Milli-Q 水をメディウムビンに

入れた。

② Milli-Q 水の体積に対して 0.1%の DEPC（Diethylpyrocarbonate）を加え（500mL のミリ Q 水に対してならば DEPC を 500μL）、蓋をきっちり締めてよく振り混ぜた。

※ DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行うこと。

③ そのまま 37℃のインキュベーター内に入れ、2 時間加温した。加温の際には 30 分に 1 回振り混ぜること。

※ 振り混ぜることでビンの蓋や首の部分、液体内に DEPC が均一に広がり、全体の RNase を失活させる。

④ ビンの蓋を十分緩めて、121℃/40 分（1 本あたり 500mL ならば）オートクレーブにかけた。

※ オートクレーブをすることにより DEPC を除去する。オートクレーブ後にも DEPC の臭いが残っている場合は、もう一度オートクレーブにかける。

※ DEPC は発癌性であるため、むやみに蒸気を吸うことのないように気を付けること。また、オートクレーブに溜まった水は気化して抜けた DEPC が溶け込んでいるので、その排水は責任を持って処理すること（大量の水と共に排水口へ流す）。

A-1-2.腹膜透析排液由来 HPMC の分離

<使用機器・器具・試薬>

- CO_2 インキュベーター（池本理科工業/10-0212）
- 遠心分離機(TOMY　RX-200　生命科学研究支援センター)
- 恒温槽
- Vortex
- 遠心ボトル(TA-18)
- 15mL 遠沈管(サンプラテック株式会社/Cat.No.26523)
- 50mL 遠沈管(サンプラテック株式会社/Cat.No.26524)
- 遠沈管立て
- 10mL ピペット(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-66100)
- ピペッター
- φ35mm シャーレ(サンプラテック株式会社/Cat.No.26500)
- パスツールピペット
- スパチュラ
- 血球計算盤
- カウンター

- Medium-199(SIGMA/Cat.No.M2154)
- PBS(SIGMA/D8537)
- EDTA(SIGMA/T4174)
- Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)

<腹膜透析排液の入手方法>

本研究で用いた腹膜透析排液から分離した HPMC は、予め本学医学部倫理委員会にて患者の腹膜透析排液の採取について承認を得ており、informed consent により了承を得た三重大学医学部付属病院透析室における腹膜透析患者より頂いた透析排液である。基本的に週 1 回排液を頂き、その都度サンプル番号(#数字)をつけた。

<前日の準備>

[操作]

① 予め、遠心ボトル、ハサミ、クランプをオートクレーブにかけて器具滅菌をしておく。

② 0.9% NaCl Solution を調整し、5.0mmol EDTA / 5ml NaCl Solution を濾過滅菌し、シリンジで吸引した後、アルミホイルで巻いてベンチ内で保存する。

<細胞分離>

[操作]

① 排液バッグから 10cm ほどのカテーテルを残して、注入側の透析バッグを切り離す。この際に、メーカー、透析液の種類、液量を確認しておく。

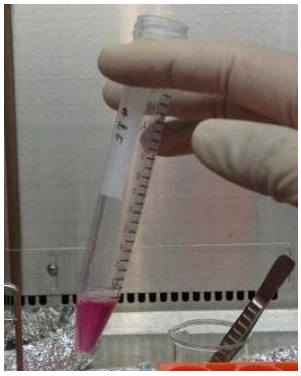
② 濾過滅菌した 5.0mmol EDTA / 5.0ml 0.9%NaCl solution を調整しておき、排液 2L に最終濃度 2.5mmol/L になるようにシリンジを用いてカテーテルからインジェクトし、無菌的に加える。

③ EDTA 溶液が排液全体に行きわたるよう混ぜる。(EDTA 溶液は排液バッグ内側に接着している細胞を剥がすためや、細胞の生理活性を上げるために入れる。)

④ 排液をよく混ぜたのち、遠心ボトル（TA-18 ボトル）に 300~400mL ずつ分注し 37℃、800rpm(50G)で 10 分間遠心分離する。(TOMY　RX-200　生命科学研究支援センター　3 階　加賀谷先生)
（この際に各ボトルの重量を求め、排液の総重量を算出する。）

⑤ 各遠心ボトルの上澄みを捨て、排液を 30mL くらいまでにし、50mL の遠心管に分注する。

⑥ 各遠心管を 750~800rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを捨て、15mL 遠心管に集め、再び 750~800rpm で 10 分間遠心分離する。



⑦ 15mL 遠心管の上澄みを捨て、10%FBS/M199 培地を 1mL 加えて細胞懸濁液を作成し、血球計算盤で細胞数をカウントする。

⑧ 接着用 φ35 シャーレに 10%FBS/M199 を加えて 37℃ / 5% CO_2 でプレインキュベートしておき、細胞懸濁液を播種する。（播種密度は 7~10×10^4 cells / cm^2 が適度だと思われるが、それ以下の場合は全細胞数を播種するといい。）

⑨ 翌日、PBS で 3 回洗浄後に培地 10%FBS/M199 を交換する。

⑩ 培地は 3 日に一回交換する。

A-1-3. 継代培養

<使用機器・器具・試薬>

- CO_2 インキュベーター（池本理科工業/10-0212）
- ウォーターバス
- Vortex
- 25cm^2 培養フラスコ(サンプラテック株式会社/Cat.No.26520)
- 6 穴プレート(友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-80060)
- φ35mm シャーレ(サンプラテック株式会社/Cat.No.26500)
- 15mL 遠沈管(サンプラテック株式会社/Cat.No.26523)
- 50mL 遠沈管(サンプラテック株式会社/Cat.No.26524)
- 遠沈管立て
- 10mL ピペット(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-66100)
- ピペッター
- パスツールピペット
- チップ各種
- セルスクレーパー(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-93170)
- カウンター
- 血球計算盤
- Medium-199(SIGMA/M2154)
- PBS(SIGMA/M8537)
- TRYPSIN-EDTA SOLUTION(10x)(SIGMA/T4174)
- Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)

<細胞の洗浄>

[操作]

① 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌した。
② 滅菌済み 10mL ピペットを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引した。
③ PBS 溶液 5mL/25cm^2 フラスコ又は 10mL/75 cm^2 フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄した。
④ 滅菌済み 10mL ピペットを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、洗浄液を吸引した。

<継代作業>

[操作]

① 冷凍保存してあるトリプシン 1mL に培地 9mL を加え、10 倍希釈した。（以下トリプシン溶液）

② トリプシン溶液 5mL/25 cm^2 フラスコ又は 10mL/75 cm^2 フラスコを加え、37℃の CO_2 インキュベート内にて 10 分間放置した。

③ 顕微鏡で細胞が剥がれたことを確認後、FBS 1mL/25 cm^2 フラスコ又は 2mL/75 cm^2 フラスコを加えた。

④ 滅菌済みセルスクレーパーを培養フラスコ内に挿入し、細胞を剥離した。

⑤ 滅菌済み 10mL ピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15ml 遠心管に入れた。

⑥ 50G（750rpm、5 分間原則 4℃）遠心分離した。

⑦ 培養フラスコに 10%FBS／M-199 を入れ、37℃の 5%CO_2 インキュベート内にて放置した。

⑧ ⑥で遠心分離した上澄みをピペットで吸引した。

⑨ 10%FBS／M-199 を 1mL 又は 3mL を遠心管に沈殿している細胞に加え、細胞懸濁液を作成し、10 回ピペッティングを行った。

⑩ 細胞懸濁液を取り、⑦で用意しておいた培養フラスコに 200μL/25cm^2 フラスコ、1mL/75cm^2 フラスコ播種し、37℃の CO_2 インキュベート内にて培養した。

A-2. 細胞面積測定法

細胞面積算出には解析ソフト“Image J”を用いた。以下の手順で測定した。

[操作]

① 位相差顕微鏡写真をほぼ毎日撮影し、confluent になるまで撮影した。

② Image J を開き、confluent の写真をドラッグして開き、「Analyze」→「Set Scale」を選択し、「Distance in Pixels:750」「Known Distance:400」「Unit of Length:μm」に設定し、OK を押した。

③ 「Analyze」→「Set Measurements」で「Area」を選択し、OK を押した。

④ 「polygon selections」を選択し、細胞の周囲を囲んだ。

⑤ 囲み終わったら、半角の m を押すことで面積が測定できた。

⑥ ④、⑤を繰り返し行った。

A-3. 膜間電気抵抗(TER)測定

A-3-1. TER 測定

[原理]

TER 測定は 2 本の電極対で構成されている STX-2 電極(Table.10-1)と EVOM ボルトオームメーターを用いて測定する。外側の電極は試料膜を介して電流を流すための微小な銀電極であり、内側の電極は電圧を測定する為の銀/塩化銀電極である。電圧検知用 20μA の交流矩形波電流を 12.5Hz の低周波で印加する。電圧を測定することで、オームの法則(R=E/I)より抵抗値を算出する。細胞間のイオンの透過に対しての抵抗を測定できることから、簡易的な細胞間の結合状態の評価を行うことができる。この装置の使い方として細胞播種時から経日的に測定を行うと細胞間結合の形成度合いが測定できる。また細胞がコンフルエントになってから細胞間結合に影響を与える可能性がある検査試薬を加えることで、細胞間結合の増減度合いが測定できる。

Table.10-1 EVOM/STX-2 電極の概要

膜電圧範囲	±199.9mV
抵抗範囲	0～1999Ω、0～20kΩ の 2 レンジ
交流矩形波電流	±20μA、12.5Hz
電極	Ag/AgCl 電極(電圧測定用) Ag 電極(電流通電用)

[試薬・器具・機器]

- 上皮膜用 Volt Ohm meter (EVOM) (Would Precision Instruments)
- EVOM 用 STX-2 電極 (Would Precision Instruments)

[操作準備・装置説明]

<STX-2 電極の消毒>

① STX-2 電極を 70%エタノールに 10 分間浸漬した。

② STX-2 電極を取り出し、10 分風乾させた。

<膜間電気抵抗測定>(Fig.10-1)

① STX-2 電極を EVOM につなぎ、電源を入れた。

② Range：2000Ω レンジ、Mode：R、Power：On、Measure：R にあわせた。

③ STX-2 電極を Transwell に挿入し、Measure ボタンを押して各 well の TER を測定した。
④ well に対する電極の一を確認し、毎回一定の位置で測定を行った。
⑤ 3 ヶ所で測定を行い、平均値を算出した(Fig.10-2)。

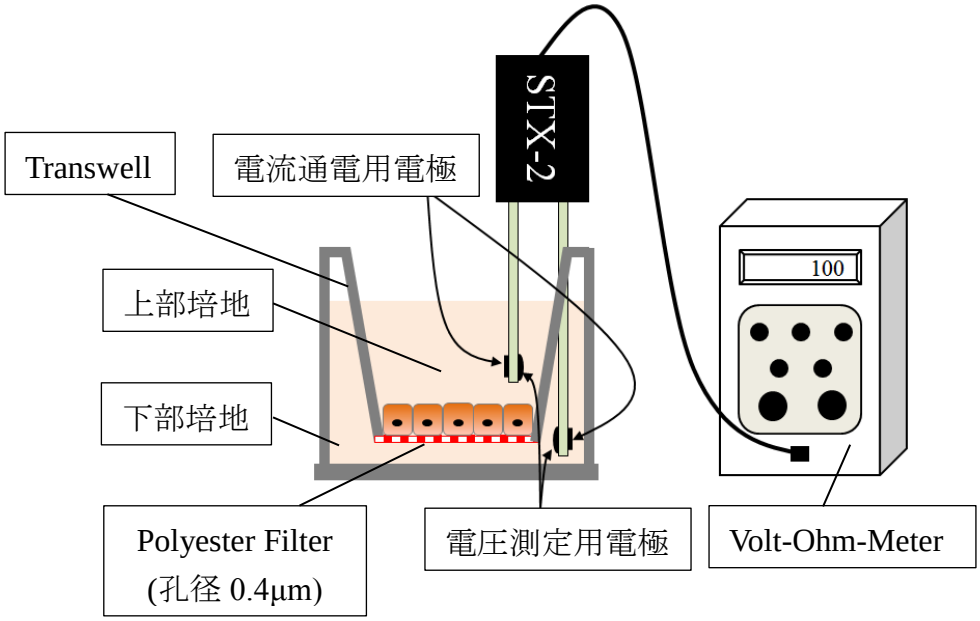
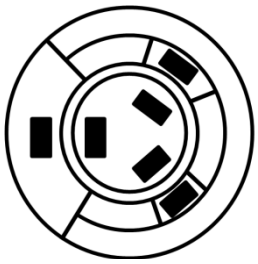


Fig.10-1　TER 測定装置



✓ 黒い■の部分で測定
✓ Transwell の空いている部分に電極を入れる

Fig.10-2　Transwell 測定場所

A-4. 免疫得蛍光染色法

[原理]

標的分子を非常的に認識する抗体の性質を利用して、細胞の中のタンパク質の局在を可視化する方法。観察したい標的分子に対する抗体(一次抗体)を加え、その次に一次抗体を認識する抗体(二次抗体)を加える。そして、二次抗体に付加されている蛍光を観察することで、標的分子の局在を知ることができる。一連の反応は全て適度な塩濃度を持った緩衝液中で行い、乾燥させないのが基本である。それぞれの蛍光物質に対応する波長の励起光当て、蛍光を検出する(Fig.10-3)。

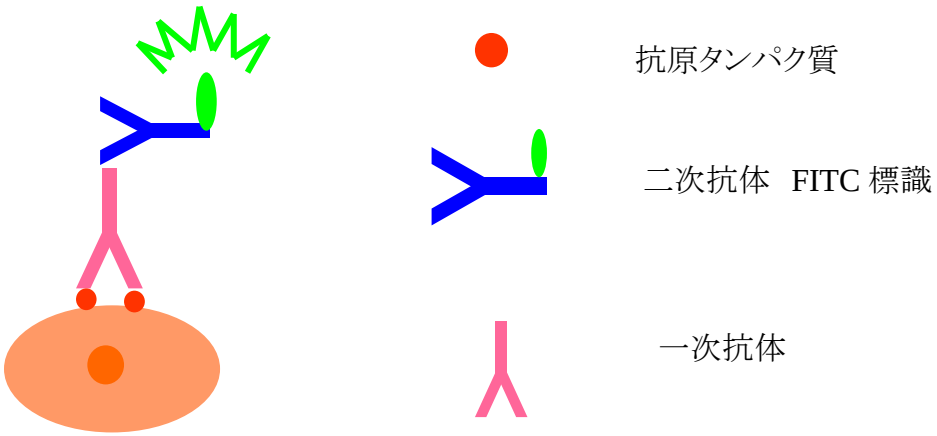


Fig.10-3　抗原抗体反応を用いた免疫化学染色

・FITC（fluorescein isothiocyanate）

緑色系の蛍光色素で、この色素は安定で、抗体活性を阻害せず、抗体への標識が容易で安定、蛍光効率が高い、最大吸収波長と最大発光波長がかなり離れているなどの標識用蛍光色素の要件をかなり満たしている。

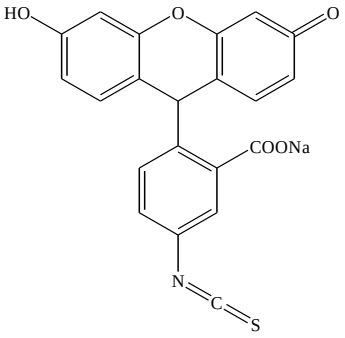


Fig.10-4 FITC

[試薬・器具・機器]

- 秤
- Vortex
- ピペット
- ピペッター
- マイクロピペット
- 遠沈管
- 遠沈管立て
- アルミホイル
- 共焦点顕微鏡(FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)
- アルブミン
- aceton (WAKO)
- methanol(WAKO)
- PBS(SIGMA)
- Polyclonal swine anti-rabbit immunogloblins/ FITC
  （Cat. No. F 0205/Lot. No. 00004918/Dako　Cytomation）
- Propidium iodide(PI) (P4170-25MG/SIGMA)
- Rabbit anti-Cytokeratin-18, human
  （Cat.No.71-1500/Lot. No. 40990540/Zymed Laboratories Inc.）
- Rabbit anti-α-SMA, human
  （Cat.No.61-7300/Lot. No. 41191369/Zymed Laboratories Inc.）

[前準備]

① 秤でアルブミンを 4g 量り取った後、50mL 遠沈管に移し、PBS をピペットで 40mL 入れ、Vortex にて遠心した。
② 作成した 1%BSA/PBS は冷蔵庫にて保存した。

[操作]

① 細胞がいる φ35 シャーレの培地を取り除き、PBS 洗浄を行った。
② Aceton/methanol(1:1)をサンプルに加えて、r.t で 5 分間静置し固定した後、その固定液を取り除き 10 分間風乾した。
③ 1%BSA/PBS をサンプルに加えて 20 分静置した。
④ サンプルに一次抗体(希釈率;抗体:1%BSA/PBS=1:200)を 1mL 加え、4℃(冷蔵庫)、飽和湿度で overnight　(10 時間以上)させた。
⑤ 一次抗体を取り除き、1%BSA/PBS で 3 回洗浄した。
⑥ サンプルに二次抗体(希釈率;抗体:1%BSA/PBS=1:200)を 1mL 加えて、ア

ルミホイルで包み、30 分間、暗所、r.t で静置した。

⑦ 二次抗体を取り除き、1%BSA/PBS で 3 回洗浄した。

⑧ 共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

[共焦点レーザー顕微鏡操作方法]

Ⅰ システムの立ち上げ

① パソコンを ON にした。

② レーザーを ON にした。

③ モニター上にパスワード入力画面が表示された後、水銀ランプを ON にした。

④ ユーザー名・パスワードを入力し WindowsXP へログオン。

User ID: Administrator
Password: fluoview

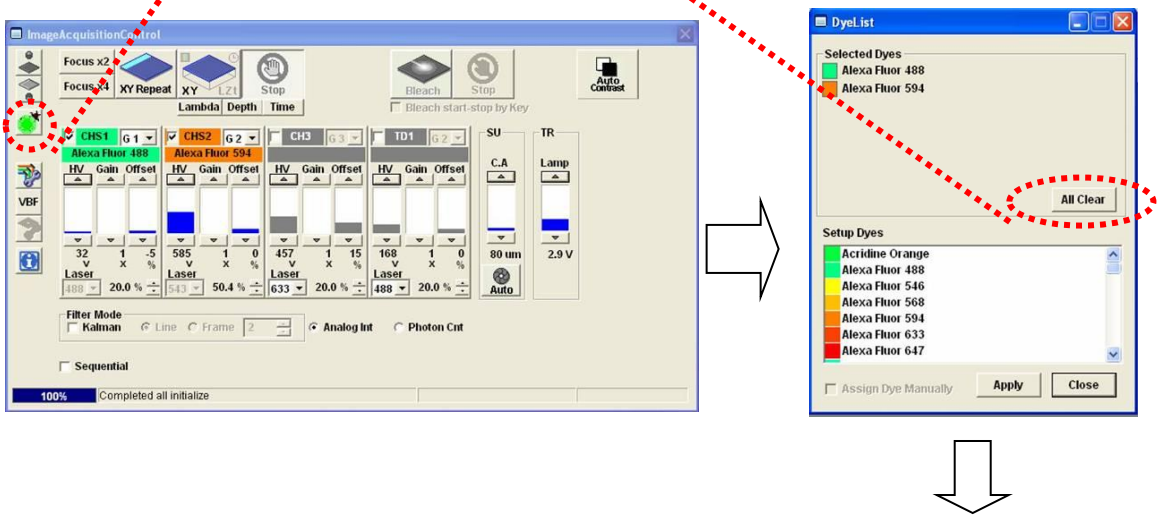
⑤

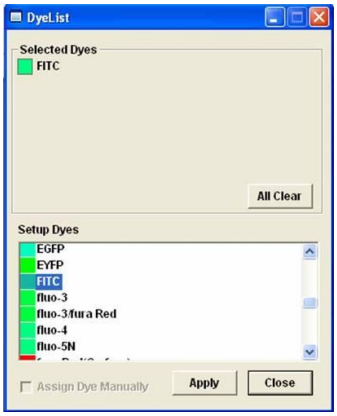
をダブルクリックしユーザー名・パスワードを入力、FV10-ASW ソフトウェアを起動した。

User ID: Administrator
Password: Administrator

Ⅱ　蛍光試薬選択

①　DyeList ボタンをクリックし、All Clear ボタンをクリックしリセットした。

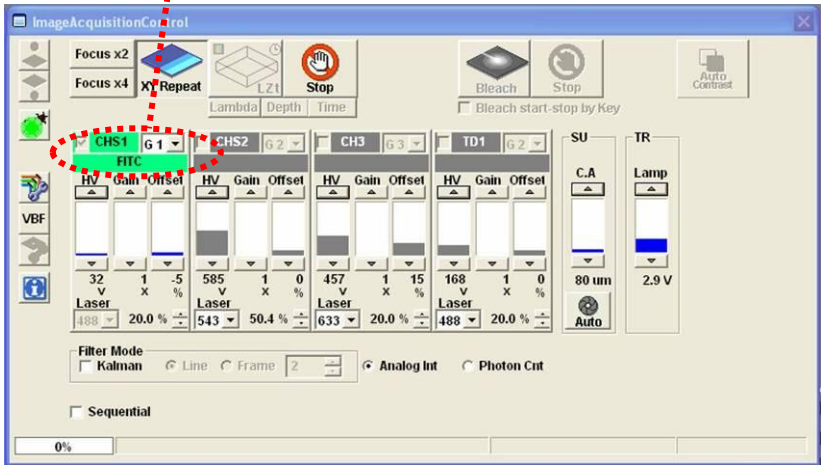




②　DyeList パネルから観察する蛍光試薬を
選びダブルクリックした。

③　Apply ボタンをクリックして閉じる。

④　CHS1 の蛍光試薬が変更したことを確認した。

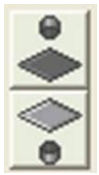


Ⅱ　顕微鏡で目視観察

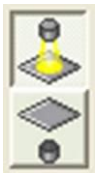
①　ハンドスイッチで対物レンズを選択した。

（10,20 倍レンズ:ドライ　40,60 倍レンズ:オイルを用いた。）

②　パソコン上のアイコンをクリックし、ハロゲンランプ、蛍光レーザーの　ON、OFF をした。



OFF



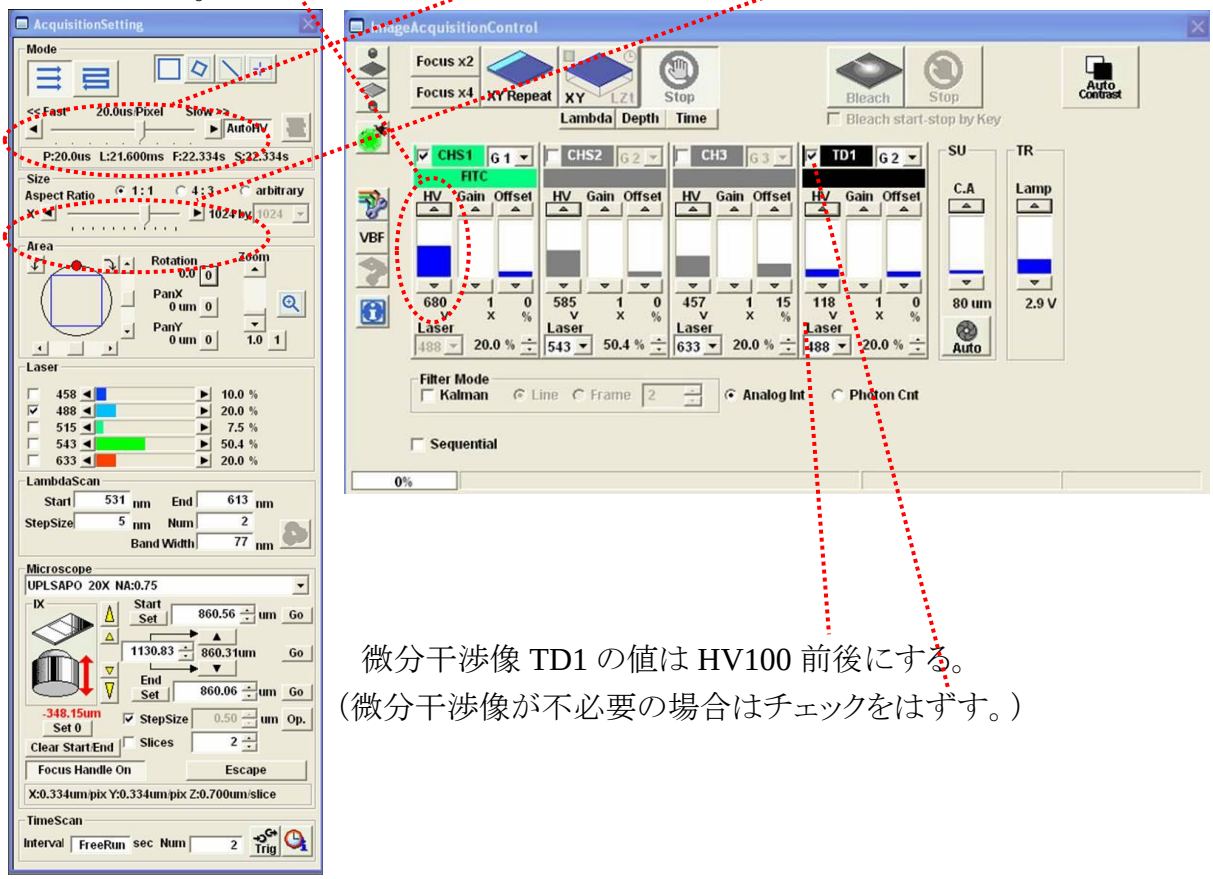
ハロゲンランプ ON

蛍光レーザーON

③　顕微鏡手前のフォーカススイッチ等によりピント調節した。

Ⅲ　画像の取得（試し撮り）

①　HV の値を 600～680、スキャン速度 8.0us/Pixel、画素数 512by にセットした。

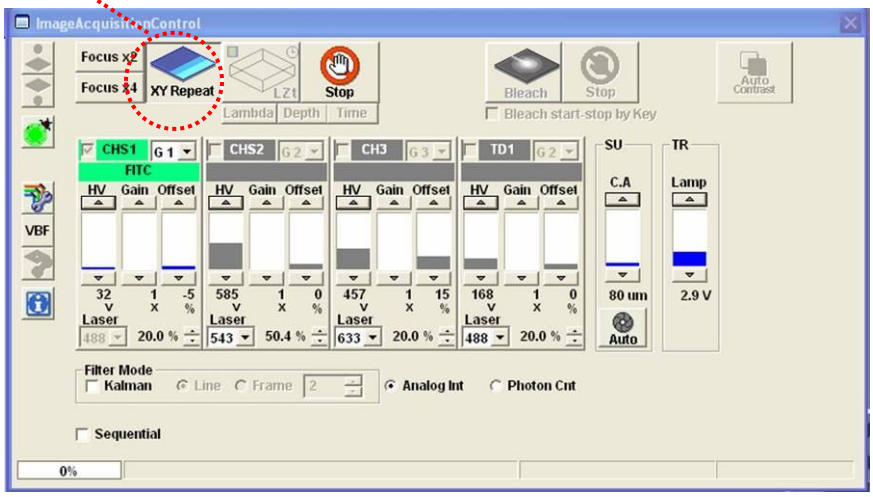


微分干渉像 TD1 の値は HV100 前後にする。

（微分干渉像が不必要の場合はチェックをはずす。）

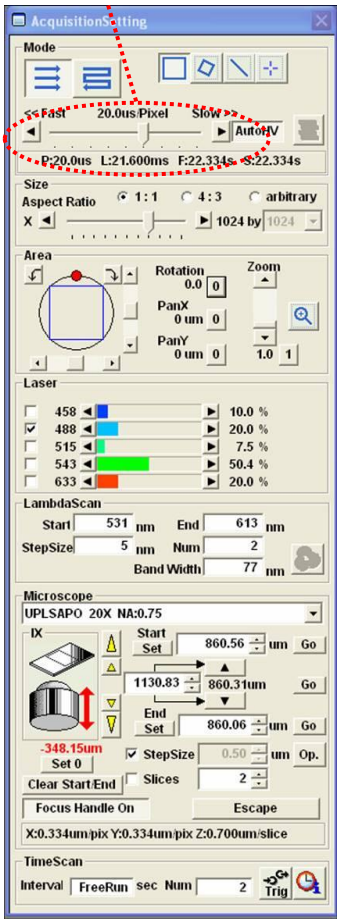
②

をクリックし、画面を見ながらピントを合わせ微調整した。

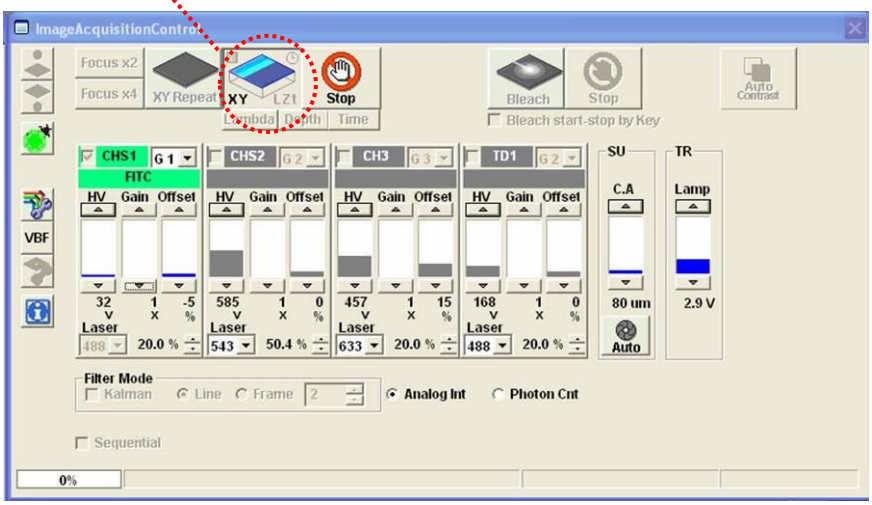


Ⅳ　画像の取得（本番）

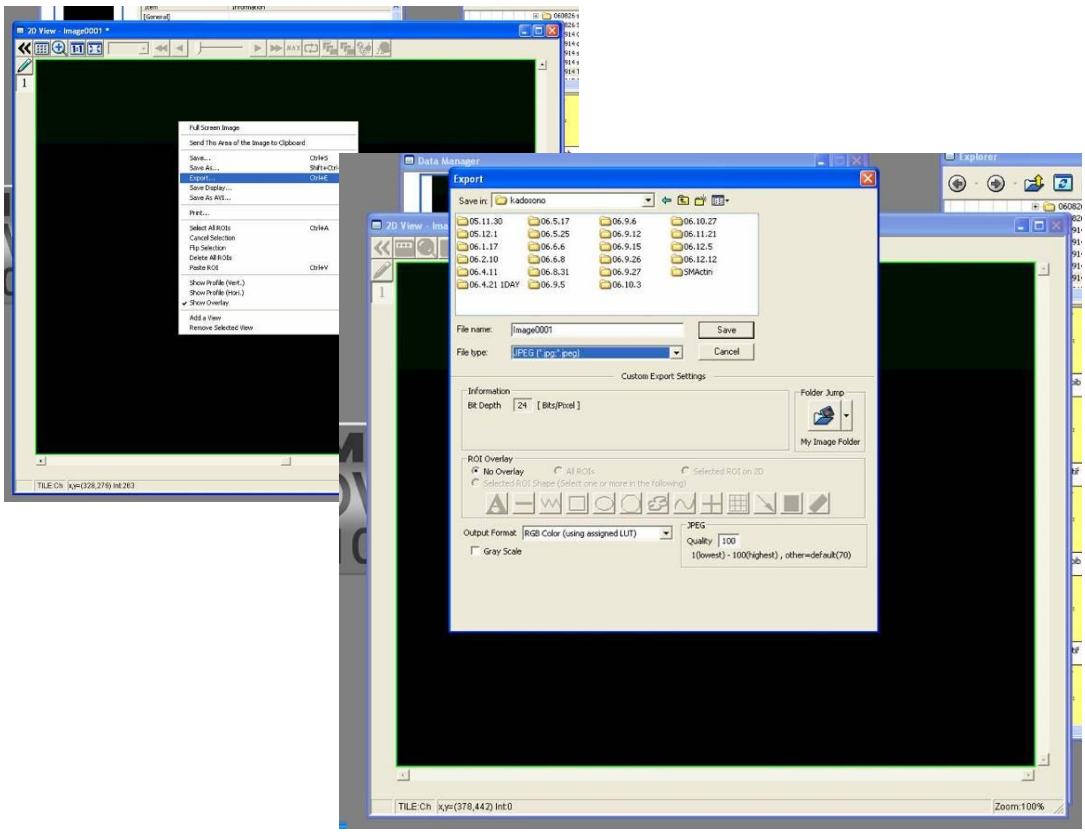
①　40.0us/Pixel に設定を変更した。



② をクリックし、画像を取得した。



③ 取得した画像の上で、右クリックし Export を選択、名前をつけて保存した。



V　システムの終了

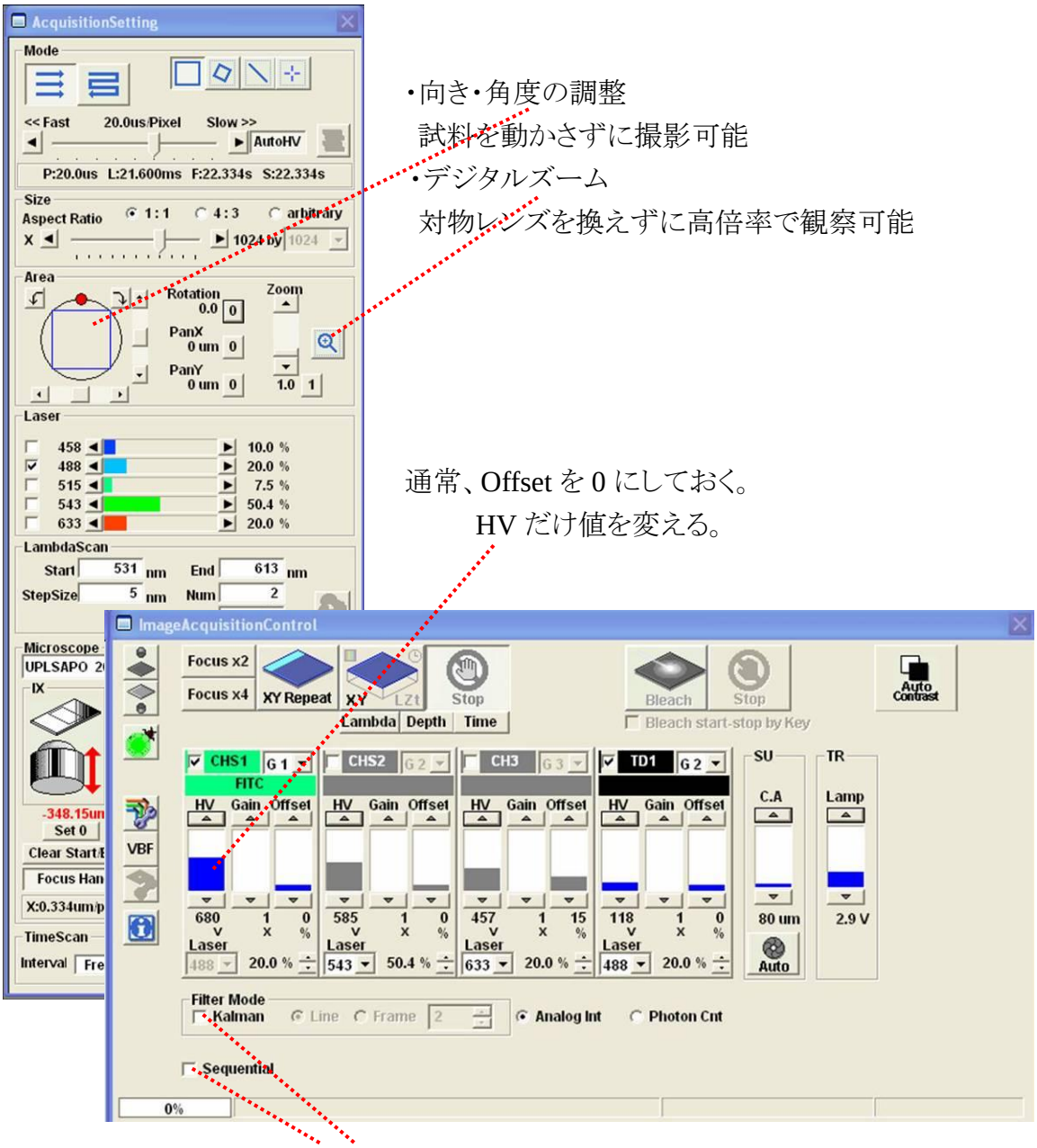
① FV10-ASW ソフトウェアを終了した。

② WindowsXP を終了した（Start/ShutDown→「ShutDown」を選択）。

③ レーザーを OFF にした。

④ 水銀ランプを OFF にした。

補足



・向き・角度の調整
試料を動かさずに撮影可能

・デジタルズーム
対物レンズを換えずに高倍率で観察可能

通常、Offset を 0 にしておく。
HV だけ値を変える。

単染色ではチェックを入れない。

A-5. AGPC 法

<原理>

RNA を構成するリボースは、DNA のデオキシリボースに比べて 2 位の炭素に水酸基が一つ多くあるため、DNA に比べて、次のような条件蚊では親水性が増すことが期待される。

核酸は、中性条件下ではリン酸基が解離して負の電荷を帯び、この部分が水和することによって高分子コロイドとして水中に分散している。ところが酸性条件下では、リン酸規の電離平衡が会合の方向に傾いてこの部分のチャージが失われるために、親水性が低下する。この状態でフェノール処理を行うとDNA は疎水性に勝るフェノール層に分配されるが、RNA はリボースの水酸基があるため水層に分配される。AGPC 法とはこの性質を利用して RNA を抽出する方法である。

一般的には、まず Guanidium thyocyanate(GTC)で RNase を失活させると同時に細胞のタンパク質を可溶化する。そして液性を酸性に保ちながらフェノール層や中間層に移行するのみならず、DNA もフェノール層に分配される。こうして得られた水層(GTC 層)には RNA のみが溶け込んでいるので、これをアルコールで塩析することでほぼ純粋な RNA が得られるわけである。本実験では、市販の RNA iso plus を用いて RNA の抽出を行っているが、その原理は基本的に同じである。

<RNA・DNA を扱う上での注意点>

細胞は原則的に受精卵が持つ全ての種類の遺伝子を持っているが、細胞の種類・状態に応じて、特定の遺伝子(DNA)が選択的に活性化している。この仲立ちをするのが mRNA であり、細胞の状態をフレキシブルに変化させるためには、いつまでも古い mRNA が残っていては具合が悪い。そこで、細胞や組織液中には RNA を速やかに分解する酵素(RNase)が豊富に含まれている。我々が RNA の分析を行う際には、この RNase による RNA の変性・分解が最大の障害となる。RNase は抽出する細胞はもちろんのこと、我々の汗・唾液・皮膚など様々な部分に存在し、また熱に対する安定性も極めて高く、なかなか失活しない(121℃の高圧蒸気滅菌にかけても活性が残る)。従って実験の成否はこの RNase の作用をいかに防ぐかにかかっている。このことを踏まえて、今後 RNA、DNA を扱う全ての実験において以下の点に気を付けること。

- ✓ 各チューブ・チップは素手で触れたものは使用しないこと。
- ✓ 使用するガラス器具は乾熱滅菌(RNase free)を行うこと。
- ✓ 実験中は必ずゴム手袋（利き腕でない方のみで良い）、マスク、帽子、白衣を着用し、唾液を飛ばさないように会話を極力控えること。

✓ ゴム手袋を着用した手ではサンプル使用以外に使用しないこと。
✓ サンプルに触れるものを素手で扱わないこと。

また、AGPC 法に特有な注意点として以下の点に気をつけること。
- 高速遠心機は予冷運転を行っておくこと。
- 操作は全体的に素早く正確に行うこと。

<使用機器・器具・試薬>
- 日立微量高速遠心機 (日立/CR15B 型)
- DNA mini (HETO LAB EQUIPMENT)
- MINI CENTRIFUGE (MVSS-06618/ COSTER)
- Vortex
- ウォーターバス
- 1.5ml チューブ (72.690S/アシスト)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- タイマー
- Crash ice 用発泡スチロール
- PARAFILM® (PM-996/ Pechiney Plastic Packaging, Inc.)
- 注射針 (NN-2432R/ TERUMO®)
- RNA iso plus (9108/ TaKaRa)
- chloroform-isoamylalcohol 24:1 (C-0549/ SIGMA)
- isopropanol (I-9516/ SIGMA)
- PBS
- 75%EtOH/DEPC 処理水溶液(無水 EtOH を DEPC 処理水で希釈)
  → 無水 EtOH (321-00025/ Wako)
- DEPC 処理水
  → Diethylpyrocarbonate (298711/ CALBIOCHEM®)
- Crash ice

<AGPC 法(前半)>

[操作]

① 細胞に刺激を与え、φ35 シャーレから培地を吸引して PBS を 1.5mL/well 加えて細胞を洗浄する。

② 洗浄後 PBS を吸引して、素早く RNA-iso plus を 1mL/well 加える。
※RNA iso plus は mRNA を核内から取り出す役割がある。
※毒性が強いので、手袋を必ず着用する。

③ ピペットチップの先端で well 内の細胞を剥がすように掻いた後、10 回程度ピペッティングを行い、室温で 5 分間静置する。
※チップは well 毎に交換すること。

④ 5 分後に②の懸濁液を 1.5mL アシストチューブに移し入れる。

⑤ チューブに入った各サンプルに chloroform-isoamylalcohol 24:1 を 200μL ずつ加え、しっかりと蓋を閉めた後 15 回程度上下に振り混ぜる。

⑥ 室温(R.T)にて 15 分間静置する。

⑦ 12000G/4℃/15 分にて遠心分離を行う。

⑧ 3 層に分離するため、最上層の溶液(透明な水層、ここに RNA が含まれる)を液面近傍よりそれぞれ 350μL ずつ採取し、別の 1.5mL アシストチューブに移し入れる。(上部の透明な水層には RNA、半固体の中間層には DNA、また赤色を呈した下層の有機溶剤層にはタンパク質、多糖、脂肪酸、細胞残滓と少量の DNA が含まれている。)
※中間層および赤色の有機溶剤層には絶対触れないこと。

⑨ 移し入れた各サンプルに isopropanol を 500μL ずつ加えて、Vortex にて攪拌し、その後すぐに-80℃の冷凍庫で一晩保存する(Over Night)。

<AGPC 法(後半)>

【全て氷上操作】

① サンプルを解凍し、Vortex 後 10 分間静置した後、12000G/4℃/10 分遠心分離を行う。
※この時チューブの継ぎ手を外側に向けて遠心分離を行うこと。
② チューブを傾け、ある程度の上澄み液を慎重に取り除く。
※沈殿は肉眼で確認できないので、チューブの継ぎ手側に沈殿が存在していると想定し、上澄み液を取り除くこと。
③ 各サンプルに 75%EtOH/DEPC 処理水溶液を 500μL ずつ加えて Vortex で攪拌した後、10000G/4℃/5 分遠心分離を行う。
④ チューブを傾け、より慎重に上澄み液をぎりぎりまで取り除く。
⑤ チューブの口に 2.5cm 四方程度の PARAFILM®を張り、注射針にて 10 個程度の穴を開ける。
※PARAFILM®は絶対に素手では触らないこと。
⑥ DNA mini にサンプルをセットし、減圧乾燥を行う。
※圧が 200atm を越えてから時間を測定すること。
※サンプル残量により乾燥時間が異なるので、乾燥しすぎないように様子を見ながら慎重に行うこと。(目安:1 セット 3～5 分)
⑦ 各サンプルに DEPC 処理水を 10μL ずつ加え、Vortex による攪拌と MINI CENTRIFUGE による軽い遠心を 2 回繰り返す。
※減圧乾燥の際に RNA が陰圧で壁に付着する可能性があるため、念入りに行うこと。
⑧ ウォーターバスにて 55℃/5 分加温後、Vortex と遠心を行い、4℃冷蔵庫にて冷却する。
⑨ 得られたサンプルは RNA の定量後、RT-PCR 法に使用する。

A-6. RNA 定量

<意味>

ここでは、分光光度計を用いて吸光度OD_{260}およびOD_{280}の測定を行い、その値をもとにして全サンプルのRNA濃度を一律に揃える。これにより、この後に行うPCRの反応生成物に定量性を持たせることができる。というのも、RT-PCR法はmRNAを鋳型にしてDNAの合成・増幅を行い、得られたDNAの定量を行うため、最初の鋳型mRNAの量にはバラつきがあると最終的なPCR反応生成物量もバラついてしまい、定量性を失ってしまうからである。

<注意点>

核酸(この場合はRNA)由来の吸光度OD_{260}とそれ以外の物質(タンパク質など)由来の吸光度OD_{280}の比(OD_{260}/OD_{280})は、サンプルのRNA純度を示しており、一般的に1.5以上が望ましいとされている。但し、いくら比が大きいとしても吸光度が低いとRNA濃度は低くなってしまうので、理想的なサンプル濃度0.2～0.5μg/μLにするためには、少なくともOD_{260}＝0.085以上は必要となる。また、逆にサンプル濃度が高すぎる場合には、希釈して用いることが必要である。

<使用機器・器具・試薬>

- Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer (170-2501/ BIO RAD)
- Cuvette (170-2505/ BIO RAD)
- MINI CENTRIFUGE (MVSS-06618/ COSTER)
- Vortex
- 0.5mLチューブ (72.699S/ アシスト)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- キムワイプ® S-200 (62011/株式会社クレシア)
- 廃液入れ
- 洗瓶(脱イオン水)
- 0.1N HCl aq
- DEPC処理水

<RNA の定量>

① AGPC 法により得られた各サンプル 10μL より 1μL ずつ採取し、サンプル数分用意した 0.5mL アシストチューブの底部にそれぞれ入れる。

② DEPC 処理水を 59μL ずつ①のチューブに入れ、Vortex で攪拌後、MINI CENTRIFUGE で軽く遠心を行う。

③ 前日より 0.1N HCl aq に浸しておいた Cuvette を脱イオン水にて良く濯ぎ、水気を切る。

④ マイクロピペッターを用いて Cuvette に DEPC 処理水を 60μL 入れ、Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer にセットし、零点補正(Read Blank)を行う。

⑤ マイクロピペッターを用いて DEPC 処理水を抜き取り、1 つ目のサンプルを 60μL 入れ、セットして、3 回吸光度測定(Read Sample)を行う。
※測定し終えたサンプルは、測定のやり直しが出来るように、再びマイクロピペッターを用いて元のチューブに戻しておくこと。

⑥ Cuvette を脱イオン水でしっかり洗浄し、水気を取る。

⑦ ⑤～⑥をサンプル数分繰り返す。

⑧ 測定結果が異常であったサンプルは再測定する。

⑨ 得られたデータを出力し、データの処理を行う。

<データ処理>

得られたデータより、次の 2 つの計算を行う。

ⅰ)各サンプルの濃度

ⅱ)全サンプルの濃度を最低サンプル濃度に合わせるために必要なサンプルと DEPC 処理水の量

それぞれに必要な計算式を以下に示す。

- サンプル濃度(μg/μL)＝(OD260)×(換算濃度)×(希釈倍率)
- RNA 最低量(μg)=最低のサンプル濃度(μg/μL)×サンプル残量(μL)
- 必要サンプル量(μL)＝RNA の最低量(μg) / 希釈対象のサンプル濃度(μg/μL)
- 必要 DEPC 処理水量(μL)＝サンプル残量(μL) － 必要サンプル量(μL)

※換算係数は RNA 測定の場合 0.04(μg/μL)

※希釈倍率は 60 倍

※サンプル残量は AGPC 法にて得られたサンプル 10μL から RNA の定量に用いた 1μL を差し引いた 9μL。

A-7. RT-PCR

<原理>

PCR は微量な DNA の存在を非常に鋭敏に検出できる方法であり、この方法を応用すれば極微量の mRNA の発現を検出することができる。しかし PCR 法に用いる DNA 合成酵素は、mRNA を鋳型として DNA を合成する活性を持たない。その問題の解決方法として重要となる反応が逆転写反応である。つまり、逆転写酵素を用いて mRNA を鋳型とした cDNA の合成反応(逆転写反応)を予め行えば、その cDNA を改めて鋳型として PCR を行うことができる。これが mRNA の発現を PCR 法によって検出する方法、すなわち RT-PCR 法である(Fig.10-5)。

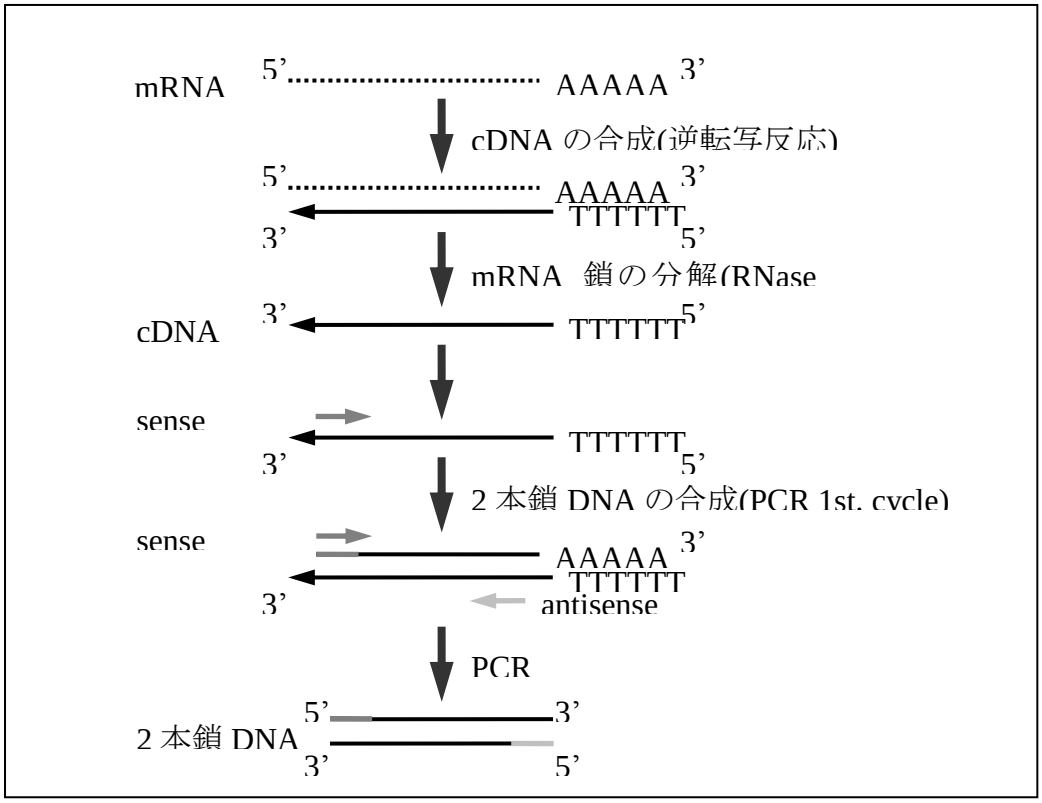


図 10-5　RT-PCR 法

A-7-1. Reverse Transcription

<原理>

細胞から発現した mRNA に Primer(Random Hexamer)を結合させて、逆転写酵素を用いて mRNA に相補的な一本鎖 DNA(cDNA)を逆転写反応により合成する。この時点では DNA と RNA が繋がった 2 本鎖の状態であり、安定性が高いため、PCR の熱変性(denature)時に十分に一本鎖にならないことがある。そのため、DNA 鎖と対をなしている mRNA 鎖を、RNA 分解酵素(RNase)を用いて分解する。これにより、完全長 cDNA を合成できる。

<注意点>
注意すべきことは、とにかく RNase の混入を防ぐことであり、詳しくは AGPC 法 Protocol 参照のこと。また、RT 法に特有の注意点として以下の点に気を付けること。

- ✓ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM に RT program 01/02 を予め入力しておくこと。
- ✓ Reaction Tube with Cap は必ず専用の滅菌缶に入れて、滅菌しておくこと。その際素手では触れないこと。
- ✓ Reaction Tube with Cap にラベルする際、分かりやすく、消えない箇所に記入すること。
- ✓ Reaction Tube with Cap は他のものと比べて脆く、力を入れ過ぎると破損する恐れがあるので十分注意すること。

<使用機器・器具・試薬>

- PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM (PC-708/ ASTEC)
- MINI CENTRIFUGE (MVSS-06618/ COSTER)
- Vortex
- Reaction Tube with Cap (N801-0540/ Micro Amp)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- Crash ice 用発泡スチロール
- Random Primers (48190-011/ Invitrogen)
- 10 mM dNTP Mix (RR006A/ TaKaRa)
- 10x Ex taq buffer (RR006A/ TaKaRa)
- RNase Inhibitor, Recombinant (SIN-201/ TOYOBO)
- Super Script™ RNase H^- Reverse Transcriptase (18080-044/ invitrogen)
- DTT (18080-044/ invitrogen)
- DEPC 処理水
- Crash ice

<RT Master Mix>

【全て氷上操作】

Table.10-2 に従い、各試薬を混合して RT Master Mix を作製する。極微量を扱うため、サンプル数丁度の量では RT Master Mix が不足する恐れがある。そのため、サンプル数が多い場合は 1、2 サンプル分多めに作製すること。その後、Table.10-3 に従って RNase inhibitor と Super Script™ を加える。

Table.10-2 RT Master Mix (単位:μL)

Sample 数	1	6(+1)	9(+2)	12(+2)	18(+3)	24(+4)
Random Primers(100mM)	1	7	11	14	21	28
dNTP Mix	4	28	44	56	84	112
10x Ex taq buffer	2	14	22	28	42	56
DTT	2	14	22	28	42	56
合計	9	63	99	126	189	252

Table.10-3 RNase inhibitor と Super Script™ の必要量(単位:μL)

Sample 数	1	6(+1)	9(+2)	12(+2)	18(+3)	24(+4)
RNase inhibitor	1	7	11	14	21	28
Super Script™	1	7	11	14	21	28
合計	2	14	22	28	42	56

<Reverse Transcription>

【全て氷上操作】

① 各サンプルを扱う前に RT Master Mix を作製する。
② RNA の定量結果に基づいて、AGPC 法により得たサンプル原液を Reaction Tube with Cap 内に希釈し、9μL とする。
③ 希釈後の各サンプル 9μL に、RT Master Mix を 9μL ずつ加えて、Vortex で攪拌し、MINI CENTRIFUGE によって軽く遠心を行う。
④ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM にサンプルをセットし、RT program 01 を実行する。
⑤ 各サンプルに RNase inhibitor と Super Script™ を 1μL ずつ加える。
⑥ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM にサンプルをセットし、RT program 02 を実行する。
⑦ 作製した RT product は-20℃の冷凍庫で保存する(数ヶ月保存可)。

A-7-2. Polymerase Chain Reaction

<原理>

PCR の原理は 3 段階から成る DNA 合成反応を繰り返して行うことにある。まず、鋳型となる 2 本鎖 DNA を加熱して変性し、一本鎖にする(denature)。次に、増幅したい特定部位の DNA 鎖の両端に相補的な 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを反応系に過剰に加えた状態で温度を下げると、プライマーが DNA 鎖の相補的な部位と 2 本鎖を形成する(annealing)。この状態で DNA 合成基質のデオキシヌクレオシド三リン酸と DNA ポリメラーゼを作用させると、ポリメラーゼはプライマー部位から DNA 相補鎖を合成していく(extension)。ここで重要なのは、最初の 2 サイクルでは長さが不定な 2 本鎖 DNA が合成されるが、3 サイクル目からはプライマー対に挟まれた部位の長さの揃った 2 本鎖 DNA が合成され、その数が急速に増えていくということである。また、1 回目の合成反応で生成した DNA は次の反応の鋳型となるため、その名称の通り連鎖反応的に DNA が合成されることから、20～30 サイクルの反応の後には、もとの鋳型 DNA 中の必要な部分配列をもつ DNA 分子を莫大な数得ることが出来る(Fig.10-6)。

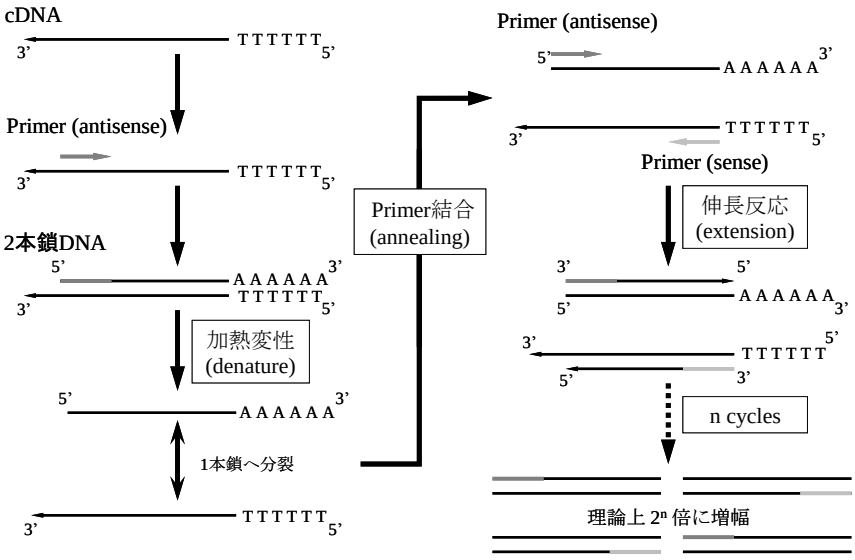


Fig.10-6　PCR の原理

＜PCR のカイネティクスとサイクル数＞

ここでは、PCR によって得られる反応生成物の量とPCR のサイクル数の関係について論ずる。PCR は 1 サイクルの反応によって目的とする DNA 断片が最大 2 倍に増えるため、初期鋳型量を I_0 とすると、n サイクル後の反応生成物量Iは、理想的には次式(Eq.A-5-1)に従って指数関数的に増加する。

$$I = I_0 \times 2^n \quad \cdots\cdots \quad \text{(Eq.A-5-1)}$$

しかしサイクル毎の増幅は、プライマーのアニーリング効率や DNA 鎖の伸長反応の効率が 100%ではないことなどの要因によって、必ずしも 2 倍にならない。このことを考慮すると、n サイクル毎の瞬間増加率を E'とした場合は、反応速度を dI/dn とした次の微分方程式(Eq.A-5-2)で与えられる。

$$dI/dn = E' \times I \quad \cdots\cdots \quad \text{(Eq.A-5-2)}$$

仮に E'がほぼ一定の値をとると考えて、E'を定数として Eq.A-5-2 を解くと、単純に次式(Eq.A-5-3)が得られる。

$$I = I_0 \times E^n \quad (※E = e^{E'}) \quad \cdots\cdots \quad \text{(Eq.A-5-3)}$$

これにより、PCR 反応生成物は増幅率を E として指数関数的に増加することが期待される。ここで、実際の PCR でも反応生成物がある程度蓄積するまでは、反応生成物は概ね指数関数的に増加しており、その指数関数的に増加している部分のデータを元に片対数で直線近似を行うと、Fig.10-7 のようなグラフが得られる。これによると反応生成物が蓄積するまでは、Eq.A-5-3 において増幅率 E を一定とみなしたモデルが妥当であることが分かる。

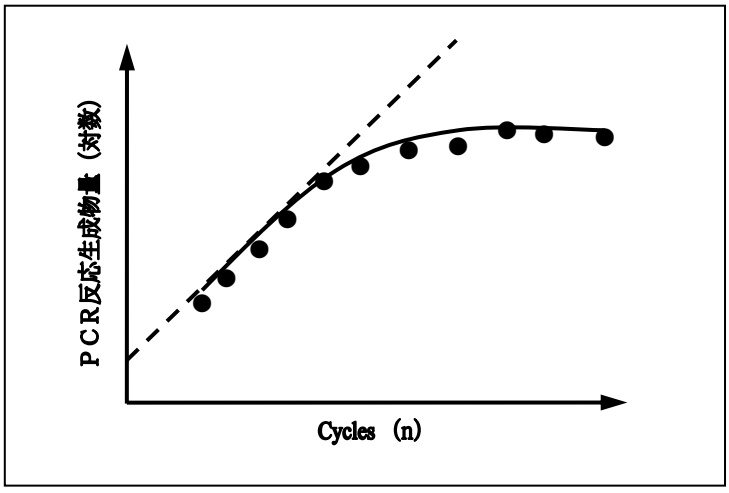


図 10-7 PCR 反応生成物量とサイクル数

しかし、反応が進んで生成物量が増加するにつれて増幅率は低下し、最終的には反応生成物量の増加は頭打ちとなり、一定の値をとるようになる。反応が停止する要因としては次の 5 つが挙げられる。

ⅰ) Taq DNA polymerase の失活
ⅱ) 反応基質(デオキシヌクレオシド三リン酸)の枯渇
ⅲ) プライマーの枯渇
ⅳ) 反応副産物であるピロリン酸による合成反応阻害
ⅴ) 生成した DNA 鎖同士の再会合によるプライミングの阻害

ⅰ)に関しては、同じサイクル数でも反応生成物量の増加が頭打ちになる場合とそうでない場合があることや、一度頭打ちになった反応液にさらに酵素を追加しても通常は反応が進行しないことから、通常の PCR サイクル数(25～30 サイクル)においては主たる限定要因にはなっていないものと考えられる。また、ⅱ)～ⅴ)の限定要因については、その効果が反応生成物量に概ね比例するものと考えることが出来る。

以上のことを考慮すれば、一般的に PCR のサイクル数は 30 サイクル前後が良いと言える。もし 30 サイクルで十分な増幅が見られない場合は、35 サイクル程度までサイクル数を増やしてみると良い。

＜反応温度と反応時間＞

非常に繊細な反応である PCR は、わずかな温度やサイクル数の変化が反応の成否を分けると言っても過言ではない。ここでは、PCR の各段階における一般的な反応温度と反応時間について論ずる。

ⅰ)熱変性(denature)の温度と時間

熱変性は 94℃×30 秒～1 分を標準とするが、液量が少ないために反応液の温度がすぐに高温に達するような場合は、30 秒以下でも十分な場合がある。ちなみに 93℃でも十分な場合が多いが、94℃まで上げておいた方が無難である。また、反応時間が長すぎると、酵素が失活してしまう点にも注意が必要である。

ⅱ)アニーリング(annealing)の温度と時間

アニーリング温度はプライマーの Tm に留意して設定する。時間は通常 1 分で良い。目的とする標的配列以外の非特異的配列が増えるようなら、2℃間隔で温度を上げてみる。全く何も増幅されないようなら、2℃間隔で温度を下げてみると良い。

ⅲ)伸長反応(extension)の温度と時間

伸長反応は通常 72℃で行う。伸長時間は標的配列の長さによって異なり、1000bp 以下の場合は 1 分で十分だが、それよりも長い配列の場合には 1000bp につき 1 分の割合で長くする。

＜Primer＞

ここにプライマーの選択のための条件を挙げる。自らプライマーを設計する場合はこれらの点に気を付けなくてはならない。

ⅰ)プライマーの長さ

標準的なプライマーは 18～28 塩基対であり、中でも 20～24 塩基対が望ましいとされている。通常この位の長さであれば、鋳型 DNA との特異的なアニーリングに十分であると考えられている。

ⅱ)CG 含有量

プライマー内で G/C 塩基と A/C 塩基がほぼ均一になるように設計することが望ましく、標準的な CG 含有量は 50%である。また、プライマーの 3'端での AT 含有量が多くならないようにする。

ⅲ)Tm 値

Tm(Melting Temperature)とは、PCR において DNA の 2 本鎖が熱変性(denature)して 1 本鎖になる温度のことであり、標準的には 55～80℃である。合成する 2 つのプライマーの Tm 値は同じであることが望ましいと考えられている。Tm 値は A と T では 2℃、C と G では 4℃を目安に計算する。いくつかのプライマーの候補がある場合、通常 Tm の高いものを選ぶ。

ⅳ)プライマー間の相補性

2 つのプライマーの、特に 3'端の間で相補性のないようにする。プライマー同士ダイマー(2 量体)を形成すると、PCR の効率が低下するためである。

ⅴ)プライマー内の二次構造

プライマー内で二次構造をとらないようにする。これは PCR を阻害するばかりでなく、プライマーを独自に合成する際の効率にも影響すると考えられるからである。

<注意点>

注意すべきことは、RNase の混入を防ぐことである。PCR 法に特有の注意点として以下の点に気を付けること。

- ✓ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM に各プライマーに対応した PCR program を予め入力しておくこと。
- ✓ サイクル数を上下させる場合は、4 サイクル刻みで増減させ、2 サイクル刻みで微調整すること。
- ✓ RT product 内に白い沈殿がある場合は、cDNA が壊れてしまっている可能性が高い。そのサンプルで PCR を行っても結果が得られない場合が多いので注意すること。
- ✓ RT 法と同様、Reaction Tube with Cap の扱いに気を付けること。

<使用機器・器具・試薬>

- PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM (PC-708/ ASTEC)
- MINI CENTRIFUGE (MVSS-06618/ COSTER)
- Vortex
- Reaction Tube with Cap (N801-0540/ MicroAmp)
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- Crash ice 用発泡スチロール
- 10 mM dNTP Mix (RR006A/ TaKaRa)
- 10x Ex taq buffer (RR006A/ TaKaRa)
- TaKaRa Ex Taq® Hot start version (RR006A/ TaKaRa)
- Primer (sense/antisense)各種
- DEPC 処理水
- Crash ice

<PCR Master Mix>

【全て氷上操作】

Table.10-4 に従い、各試薬を混合して PCR Master Mix を作製する。プライマーは目的に応じて変更する。RT Master Mix と同様に、サンプル数が多い場合は 1,2 サンプル分余分に PCR Master Mix を作製すること。また、AmpliTaq Gold™ は各サンプルを加える直前に加えること。

Table.10-4 PCR Master Mix(単位:μL)

Sample 数	1	6(+1)	9(+2)	12(+2)	18(+3)	24(+4)
dNTP Mix	4	28	44	56	84	112
Primer(sense / 20μM)	1.25	8.75	13.75	17.5	26.25	35
Primer(antisense / 20μM)	1.25	8.75	13.75	17.5	26.25	35
10x PCR buffer	5	35	55	70	105	140
DEPC 処理水	36.25	253.75	398.75	507.5	761.25	1015
Ex Taq®	0.25	1.75	2.75	3.5	5.25	7
合計	48	336	528	672	1008	1344

<Polymerase Chain Reaction>

【全て氷上操作】

① RT 法により作製した各 RT product から 2 μL ずつ採取し、予め用意しておいた Reaction Tube with Cap に移し入れる。

② PCR Master Mix を作製し、Vortex による撹拌と MINI CENTRIFUGE による軽い遠心を行う。

③ で用意したチューブに PCR Master Mix を 48 μL ずつ加え、Vortex による撹拌と MINI CENTRIFUGE にて 1 分間遠心を行う。

※ GeneAmp® PCR system 2400(サーマルサイクラー)を使用する場合、PCR 中にサンプルが蒸発して組成が変化するのを防ぐため、この時点で各サンプルの液面に MINERAL OIL(SIGMA/M5904)を 50 μL ずつ壁伝いにゆっくりと流し込む。

④ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM にサンプルをセットし、各プライマーに合った PCR program を実行する。

⑤ 作製した PCR product は-20℃の冷凍庫にて保存する(数ヶ月保存可)。

A-7-3. Gel Electrophoresis

<原理>

核酸やタンパク質などの生体高分子を分析する手段として、電気泳動法は極めて有効な技術の一つである。電解液を含むアガロースやポリアクリルアミドなどのゲルに電場をかけると、その中を荷電粒子が移動する。このとき荷電粒子の大きさ、形、荷電量などの違いによって、粒子の移動速度に差が生じる。この移動速度の差を利用して様々な分子を分離する方法が電気泳動法である。

核酸を構成しているヌクレオチドは、塩基とリン酸基が電離して電荷を帯び易い。2 本鎖 DNA の場合、塩基の電荷は相補鎖間の水素結合で互いに打ち消し合っているため、分子全体としてはリン酸基のマイナス電荷のみが主となる。また、このリン酸基の個数(荷電)はヌクレオチド数(DNA の分子量)に比例するため、全ての DNA 分子は質量あたり一定の力で引かれることになる。さらに、こうして 2 重螺旋構造をとっている DNA は塩基配列に関わらず同じ線状分子の形をしており、立体構造は泳動度にほとんど影響を与えない。即ち、唯一泳動度に影響を与えるのが分子の大きさ(長さ)ということになる。

鎖状分子の DNA はゲルマトリックスの網の目の隙間を移動する際、分子量の大きな長い分子ほどマトリックスへの引っ掛かり(マトリックス分子との相互作用)が増えるため泳動速度が遅くなる。従って、2 本鎖 DNA の電気泳動の場合、DNA の塩基配列に関係なく、DNA 鎖の長さのみに依存した電気泳動パターン(即ち、長いものほど泳動距離が短い)が得られる。

<注意点>

AGPC 法、RT 法、PCR 法に比べそれほど神経質にならなくても良いが、ゴム手袋(両手が better)と白衣は必ず着用すること。RNase の混入を防ぐ意味もあるが、ここではむしろ Ethidium Bromide から身を守るためにあると言っても良い。

☣Ethidium Bromide

Ethidium Bromide は核酸のバンド検出に用いられる蛍光試薬であり、2 本鎖 DNA の間に挿入(インターカレーション)されるという性質上、DNA の正常な複製や転写を妨げ、突然変異誘起させるという効果から、強力な発癌作用と毒性が生まれる。取り扱いには必ずゴム手袋をはめ、粉末の計量にはマスクを着用すること。また、Ethidium Bromide を含んだ泳動用 buffer などの廃液やアガロースゲル、廃チップや廃ビンは必ず他のものと区別して集め、適切な処置を施してから廃棄すること。もしくは業者に委託して廃棄してもらうこと。

また、電気泳動に特有の注意点として、以下の点に気をつけること。

✓ 使用する三角フラスコとメスシリンダーは口にアルミホイルで蓋をし、180℃、8時間以上(Over Night)乾熱滅菌を行うこと。

<使用機器・器具・試薬>

- Wide Mini-Sub Cell® GT System (170-4485/ BIO RAD)
- POWER PAC 300 (282 BR 11443/ BIO RAD)
- LIBROR (AEL-200/ 株式会社 島津製作所)
- 電子レンジ
- ゲル作成用三角フラスコ (100ml)
- メスシリンダー (100ml)
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- アルミホイル
- サランラップ
- PARAFILM® (PM-996/ Pechiney Plastic Packaging, Inc.)
- NuSieve® GTG® Agarose (F0080/ Lonza)
- Ultra Pure™ Agarose (16500-100/ Invitrogen)
- 50x TAE buffer (24710-030/ INTERGEN)
- 10x TAE buffer (15558-042/ Invitrogen)
- Ethidium Bromide (E-1510/ SIGMA)
- Blue Juice™ (10816-015/ Invitrogen)
- DEPC 処理水

<Agarose Gel(3% wt/vol)の作製>

① Wide Mini-Sub Cell® GT System の Gel caster にゲルトレイをセットし、水準器を用いてゲルトレイが地面に対し水平になるように調整する。
② NuSieve® GTG® Agarose とUltra Pure Agarose を秤量し、乾熱滅菌済みのゲル作製用三角フラスコに入れる(Table.10-5)。
※秤量には薬包紙ではなく、乾熱滅菌した三角フラスコの口を包んでいた、アルミホイルを用いること。また、アルミホイルの内側は素手で触らないこと。
※秤量にはスパチュラを用いないこと。
③ 50x TAE buffer を乾熱滅菌済みのメスシリンダーに入れ、DEPC 処理水を所定量加え、50 倍に希釈し、1x TAE buffer(from 50x)を作製する(Table.10-5)。

Table.10-5 Agarose Gel(3% wt/vol)作製に必要な各薬の量

NuSieve® GTG® Agarose(g)	1.2	50x TAE buffer(mL)	1.2
Ultra Pure Agarose(g)	0.6	DEPC 処理水(mL)	58.8
合計(g)	1.8	合計(mL)	60

④ ②の三角フラスコに③で調整した 1x TAE buffer(from 50x)を加え、ゲルの塊が出来ないように振り混ぜた後、buffer の蒸発を防ぐためサランラップでフラスコの口を閉じ、電子レンジを用いて加熱して agarose を溶解させる。
※サランラップにはピンセットで二ヶ所穴を開けておくこと。
※細かい気泡が出なくなり、完全に透明になるまで加熱すること。
※急騰防止のため、様子を見ながら行うこと(目安:30 分毎に止めること)。
※加熱し過ぎて buffer が多量に蒸発した場合、ゲルの濃度が変わってしまうため 1x TAE buffer(from 50x)を適量加えること。
⑤ 完全に溶解させたアガロース溶液に Ethidium Bromide を 6μL 加えてよく振り混ぜた時、ゲルトレイに気泡が出来ないようにゆっくりと流し入れ、気泡が付着しないようにコームをセットする。
⑥ 20 分程度静置しゲルを固めた後、10x TAE buffer を DEPC 処理水で 10 倍に希釈して作製した 1x TAE buffer(10x TAE buffer: 2 mL; DEPC 処理水: 18 mL)にてゲル表面を浸し、冷蔵庫に 10 分程度入れて完全に固めた。

<Gel Electrophoresis>

① 水準器を用いて、地面に対して水平になるように調整した Wide Mini-Sub Cell® GT System の泳動槽に、1x TAE buffer(10x TAE buffer: 60 ml; DEPC 処理水: 540 ml)を 600mL、Ethidium Bromide を 20μL 加える。
② 完全に固まったゲルからコームを慎重に抜き取り、サンプル側が陰極となるように、ゲルトレイごと泳動槽に移し入れる。
※ゲル本体及び穴が崩れた場合は作り直すこと。
③ PARAFILM®を 20cm 程度切り出し、その上に Blue Juice™ を 3μL ずつ滴下する。
※Blue Juice™ はすぐに乾燥してしまうため、1 度に全サンプル分を滴下しない方が良い。
④ 各 PCR product から 10μL ずつサンプルを採取し、Blue Juice™(3μL)に加えた後ピペッティングを行い、ゲルの所定の穴に静かに流し込む。
⑤ Positive Control を 10μL 採取し、所定の位置の Blue Juice™(3μL)に加えた後ピペッティングを行い、ゲルの所定の穴に静かに流し込む。
※混合後の溶液(13μL)は残さず吸い取り、流し込む。
⑥ 電流がゲル内をまっすぐに流れるようにゲルトレイの位置を調整する。
⑦ 電極を取り付け POWER PAC 300 に接続した後、80V 80mA 60 分の条件で泳動を開始する。

A-7-4. PCR 反応生成物の確認と定量化

<原理>

核酸は 280 nm 付近の波長に吸収ピークがある。この核酸の UV 光を吸収する性質は、対象となる 2 本鎖 DNA の内部に Ethidium Bromide 分子を挿入(インターカレート)することで PCR 反応生成物の確認に応用することが出来る。即ち、核酸(ここでは 2 本鎖 DNA)に吸収された 280 nm の UV 光が Ethidium Bromide 分子にエネルギー転移されると、励起されて 590 nm の蛍光を放射する。Ethidium Bromide 本来の吸収は 300 nm なので、この 300 nm の波長をあまり含まず、280 nm 付近の波長を豊富に含む UV 光で Ethidium Bromide 染色を行ったゲルを照らすと、遊離した Ethidium Bromide 分子は励起されず、インターカレートした分子のみが DNA からのエネルギー転移により励起されて蛍光を発する。つまり、ゲル中で 2 本鎖 DNA が存在する部分のみが光るということになる。この蛍光強度は概ねインターカレートした Ethidium Bromide 分子の個数に比例し、また、インターカレーションは 2 本鎖 DNA の量(長さ×本数)に比例して起こるため、蛍光強度を測定することでゲル中の DNA 量を推定することが可能になる。但し、測定する 2 本鎖 DNA が全て十分量の Ethidium Bromide と結合し、飽和していなければ、その定量は意味を成さないので注意しなくてはならない。

＜内部標準＞

内部標準とは、それぞれ検出したサンプル量を補正するために必要となる基準のことである。定量的 PCR 一般において一義的に明らかにされることは、反応系に加えたサンプルに含まれる目的 DNA の相対量であり、絶対量ではない。その絶対量を知るためには、予め絶対量の分かっている DNA で標準サンプルを調整して PCR を行い、目的 DNA と標準サンプルとの相対量を比較する必要がある。この標準となるものを内部標準という。本研究で用いた GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)は house keeping gene の一種であり、組織によって発現量に差がないため内部標準として用いることが出来る。また、GAPDH の他にも α-actin や β-actin なども内部標準としてよく用いられる。

— 補正の具体例 —

2 つのサンプル A、B と遺伝子 X(目的物)、内部標準遺伝子 N を考える。A と B それぞれにおける X の発現量を比較する場合

ⅰ)遺伝子 X の定量結果 A : B = a : b だけでは A 中の X は B 中の X の a/b 倍多い(もしくは少ない)量が入っているという「相対量」しか分からない。

ⅱ)ところが、絶対量が分かっている内部標準遺伝子 N の定量結果 A : B = m : n から A 中の N と B 中の N それぞれの絶対量 m、n を知ることが出来る。また、A 中の N と B 中の N それぞれの相対量(m/n 倍多い、少ない)も知ることが出来る。

ⅲ)そこで、)で分かった X の相対量を、ⅱ)で分かった N の絶対量で補正すれば X の発現量の絶対量 a/m と b/n を求めることが出来る(Table.10-6)。

Table.10-6 目的遺伝子の相対量と絶対量

	A	B	量
目的遺伝子X相対値	a	b	相対量
内部標準遺伝子Nの相対値	m	n	絶対量
Nで補正したXの相対値	a/m	b/n	

<注意点>

ここでも Ethidium Bromide 汚染の危険性があるため、その扱いには十分注意すること。また、PCR 反応生成物の確認と定量化に特有の注意点として、以下の点に気を付けること。

- ✓ ゲルは崩れやすいため、無理な力を加えないこと。
- ✓ ゲルをイメージアナライザーに付属のプレートに移す際は、隙間に気泡を入れないこと。
- ✓ フロッピーディスクに画像データ(jpeg 形式)を記録する際は、自動的にファイル名が連番の番号のみとなるため、大量に撮影する場合には、どの画像がどの結果なのか確認できるようにしておくこと。

<使用機器・器具・試薬>

- イメージアナライザー一式 (FAS-III/TOYOBO)
- Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™ (50N31000-11851/ Media Cybernetics®)
- パソコン
- フロッピーディスク (Windows®フォーマットのもの)
- サランラップ

<PCR 反応生成物の確認>

① 電気泳動終了後、ゲルをイメージアナライザーに付属のプレートに移してセットした後、蛍光灯の電源を入れモニターに写ったゲルの位置を調整する。
② UV トランスイルミネーターより UV 光を照射し、バンドの確認を行う。
③ 鮮明なバンドの確認が出来た場合、露光時間を変えて数パターンの写真を撮影し、付属のドライブよりフロッピーディスクに画像データ(jpeg 形式)を記録する。
④ Positive Control を含め、バンドが確認できなかった場合は、作製したゲルや電気泳動〔操作〕に問題があったと考えもう一度やり直す。
⑤ 記録した画像データをパソコンに移し、画像解析ソフト Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™を用いてバンドの解析を行う。

<データの扱い・処理>

画像解析ソフト Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™を用いて以下の 2 点を解析する。尚、解析<操作>はソフトに付属の取扱説明書に従って行う。

i) 各泳動レーン内の目的のバンドを選定し、バンドの輝度(max.OD)を測定する。

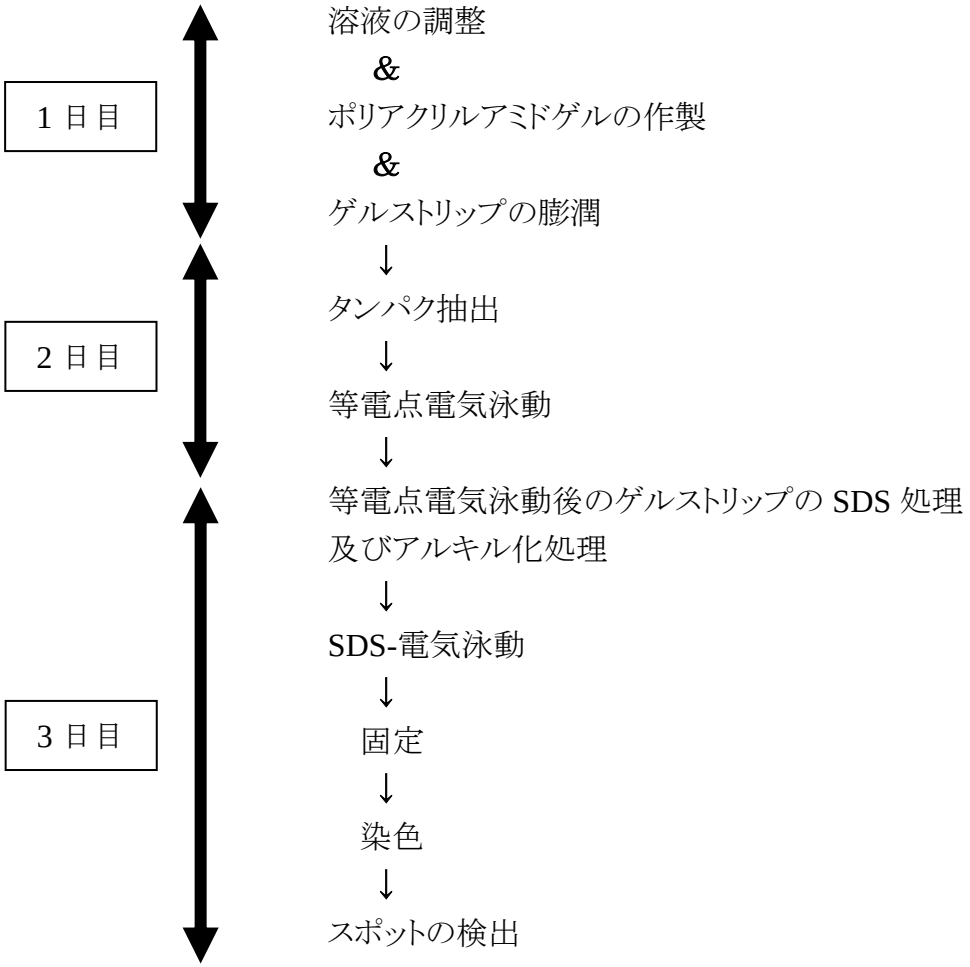
得られた各データ値は内部標準のデータ値で規格化する。

A-8. 二次元電気泳動

○目的

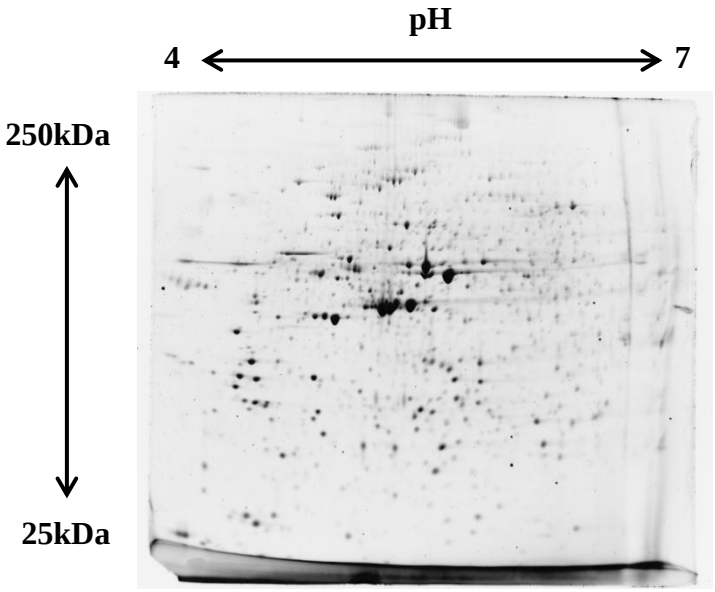
細胞や組織に存在するタンパク質を電解の電気泳動により二次元的に分離することで、通常の分子量で分離する SDS-PAGE より多くのタンパク質の変化・定量を行う。

○操作の流れ



○測定の原理

細胞や組織に存在するタンパク質を二段階の電気泳動により二次元的に分離する手法である。一次元目は等電点電気泳動によりタンパク質を分離し、二次元目はSDS-PAGE により分子量で分離する。



A-8-1. 溶液の調整およびゲルの作成

○溶液調整

基本的に使用する溶液は用事調整

<使用器具・試薬>

- Urea (219-00175/Wako)
- Thiourea (208-01205/Wako)
- CHAPS (347-04723/Wako)
- Dithiothreitol(DTT) (045-08974/Wako)
- Pharmalyte(pH 3-10) (17-0456-01/GE)
- Protease Inhibitor
- Triton X-100 (T9284/Sigma)
- Acetic acid (017-00256/Wako)
- Bromophenol Blue (BPB) (M8G8844/半井化学薬品株式会社)
- Tris (207-06275/Wako)
- HCl (080-01066/Wako)

- SDS (199-07141/Wako)
- Glycerol (17018-25/Nacalai)
- Iodoacetamide (095-02891/Wako)
- Glycine (077-00735/Wako)
- Methanol (137-01823/Wako)
- Flamingo (x10) 溶液 (161-0491/Bio-Rad)
- Milli-Q

<タンパク抽出液>

- Urea 1.50g
- Thiourea 0.75g
- 20%(w/v)CHAPS (0.10g) 0.50mL
- Dithiothreitol(DTT) 0.05g
- Pharmalyte(pH 3-10; 使用ゲルの pH に合わせる) 0.10mL
- Protease Inhibitor 適量

以上を Milli-Q で 5mL にメスアップする。

*タンパク抽出液は DTT を入れずに 1mL ずつに分注し、冷凍庫で保存可能。
*DTT は強力な還元剤であるため、使用直前に入れる。
* Pharmalyte はゲルの pH レンジをカバーしているものを選択すること。

<一次元目ゲル膨潤液 (ゲルストリップ 4 本分) >

- Urea 7.2g
- Thiourea 3.04g
- 20%(w/v)Triton X-100 2mL
- Dithiothreitol (DTT) 0.04g
- Pharmalyte (pH 3-10; 使用ゲルの pH に合わせる) 0.20mL
- 0.1M acetic acid 0.50g
- 0.1%(w/v) BPB 0.50mL

以上を Milli-Q で 20mL にメスアップする。

*DTT は使用直前に入れる。
*BPB は着色するためであり、上記の通りの用量でなくても良い。

*20%(w/v)Triton X-100 は作り置き可能(約 1 年)
*0.1M acetic acid は作り置き可能(約 1 年)
* Pharmalyte はゲルの pH レンジをカバーしているものを選択すること。

<SDS 処理化液 (ゲルストリップ 2 本分) >

• Urea	3.63g
• Dithiothreitol (DTT)	0.05g
• 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	0.5mL
• 10% (w/v) SDS	2.00mL
• 0.1%(w/v) BPB	0.25mL
• 50%(v/v) Glycerol	5.00mL

*DTT は使用直前に入れる。
*BPB は着色するためであり、上記の通りの用量でなくても良い。
*0.5M Tris-HCl, pH 6.8 は作り置き可能(約 1 年)
*10% (w/v) SDS は室温で保存可能
*50%(v/v) Glycerol は作り置き可能(約 1 年)

<アルキル化処理液 (ゲルストリップ 2 本分) >

• Urea	3.63g
• Iodoacetamide	0.45g
• 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	0.50mL
• 10%(w/v) SDS	2.00mL
• 0.1%(w/v) BPB	0.25mL
• 50%(w/v) Glycerol	5.00mL

*BPB は着色するためであり、上記の通りの用量でなくても良い。

<SDS-泳動バッファー (Tris-Glycine 系) >

10x バッファー

- Tris 30.3g
- Glycine 144g
- SDS 10g
- Distilled Water to 1000mL

1x バッファー

- Tris 3.03g
- Glycine 14.4g
- SDS 1.0g
- Distilled Water to 1000mL

*二次元目の電気泳動では約 1.8L 使用するため 1 日目に作製するとよい。
*10x バッファーの場合はストックしておき、使用前に 10 倍希釈して用いる。
*このバッファーは陰極側も陽極側も同じバッファーで良い。

<タンパク固定液 (500mL / 二次元目ゲル 2 枚分) >

- メタノール 250mL (終濃度 50%)
- 酢酸 50mL (終濃度 10%)
- Milli-Q 200mL

*使用後はシンクには捨てずに 5 研のポリタンクへ捨てる。
*タンパク固定液は二次元目の電気泳動終了 30 分ほど前に作製する。
*タンパク固定液は SDS-電気泳動中に作製するとよい。

<染色液 (400mL / 二次元目ゲル 2 枚分) >

- Flamingo (x10) 溶液 40mL
- Milli-Q 360mL

*染色液は 1x の溶液を作製しておき、4℃で保存しておく。
*染色液は 5 回ほどリユース可能。
*SYPRO Ruby でも染色可能。ここでは Flamingo のみの組成を記す。

○ゲルの作成

ゲルメーカーにて作製する場合、4 枚作製する場合は 240mL、2 枚作製する場合は 160mL 調整する。

ゲルメーカーを使用しない場合は、1 組あたり 40mL 調整する。

*ゲルメーカーを使用して 1 枚作成する場合は 80mL 調整する必要がある。

10%アクリルアミド溶液

ゲル枚数	1 枚	2 枚	4 枚
ゲルメーカーの使用	**無**	**有**	**有**
全体量	40mL	160mL	240mL
30% Acrylamide, 0.8%Bis	13.3mL	53.3mL	80mL
1.5M Tris-HCI pH8.8	10mL	40mL	60mL
Water	16.1mL	64.2mL	96.3mL
10% SDS	0.4mL	1.6mL	2.4mL
10% APS	175µL	0.7mL	1.1mL
TEMED(**直前**)	30µL	120µL	180µL

※約 1 時間程度脱気させる(TEMED を加える前)。

*ゲル濃度は 10%~12.5%の範囲で作製する。(これ以外の濃度ではゲルが破損しやすいため)

*TEMED は開始剤のため、流し込む直前に入れる。

*1.5M Tris-HCl pH 6.8 は 4℃で保存可能。

*10% SDS は室温で保存可能。

*10%APS は用事調整が好ましいが、4℃で保存可能。(約 1 週間)

*ゲルは 30 分で固まるが、一晩室温にて重合させた方が綺麗なスポットが得られる。

*ゲルの保存はジップロックに Milli-Q を入れ湿潤状態を保っていれば、4℃で 1 週間保存可能。

○泳動用プレートの組み立て方法

<使用器具・試薬>

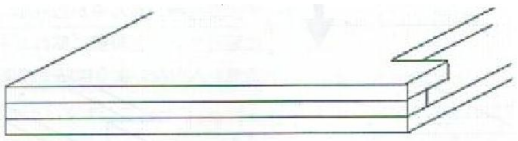
- SDS-PAGE 用ゲルメーカー (3037-00/anatech)
- セパレーター (3037-00/anatech)
- ダミーアクリルプレート (3022-07/anatech)
- アンダープレート (3037-00/anatech)
- ポリエステル粘着テープ (3070-41/anatech)
- サージカルテープ (3070-38/anatech)
- SDS ゲル作製コーム (3068-40/anatech)
- 泳動用プレート(プレーン) (3068-34/anatech)
- 泳動用プレート(ノッチ、スペーサー付き) (3068-35/anatech)

<操作>

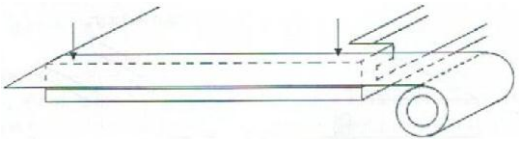
① 泳動用プレートを 99%エタノールで拭き、乾拭きしてプレートを綺麗にする。

② スペーサーが内側に来るように泳動用プレートを合わせる。

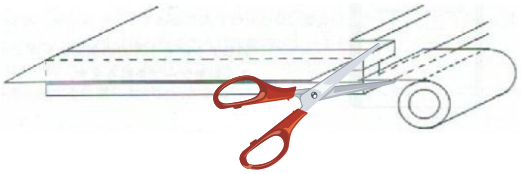
③ 側面の片側をクリップなどで留め、ズレないように固定し、台の上に寝かせて置く。



④ 泳動用プレートの両端(矢印の部分)にポリエステル粘着テープをあて、その後シワの無いように貼り付ける。

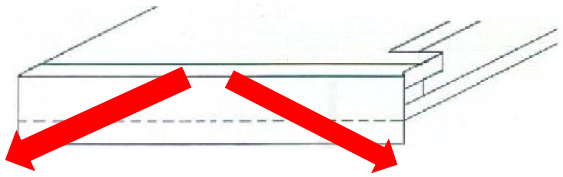


⑤ 泳動用プレートの端に合わせてポリエステル粘着テープを切断する。

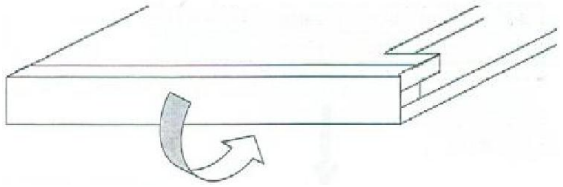


⑥ ポリエステル粘着テープを角の所でしっかりと折り目をつける。

⑦ 泳動用プレートの側面にテープを当て、真ん中から外側に向けて順に貼っていく。(この時、空気が入らないように貼る。)



⑧ 同じように角にしっかりと折り目をつけて、同様に貼り付ける。



⑨ 同様にもう片方の側面にもポリエステル粘着テープを貼る。

⑩ ゲルメーカーに泳動用プレートをセットする。
この時に、泳動プレートがゲルメーカー本体の高さと、同一もしくは 0.5mm 程度高いことを確認する。もし、低い場合にはセパレーターをもう一枚追加する。

⑪ 先述のアクリルアミド溶液に開始剤の TEMED を入れ、少し混ぜたのちにゲルメーカーにアクリルアミド溶液を流し込む。
*アクリルアミド溶液は TEMED 以外をいれて、脱気させておく。(ゲル中に気泡が入るのを防ぐため。)
*ガラス板の間にはスペーサーを挟むことを忘れない。(忘れるとガラス板同士がくっつき、剥がれない。)
*ゲルは 30 分で固まるが、一晩室温で重合させた方が綺麗なスポットが得られる。

<補足>

12.5%アクリルアミド溶液作製の場合

ゲル枚数	1 枚	2 枚	4 枚
ゲルメーカーの使用	無	有	有
全体量	40mL	160mL	240mL
30% Acrylamide, 0.8%Bis	16.7mL	66.7mL	100mL
1.5M Tris-HCI pH8.8	10mL	40mL	60mL
Water	12.5mL	50.0mL	74.9mL
10% SDS	0.4mL	1.6mL	2.4mL
10% APS	175µL	0.7mL	1.1mL
TEMED(直前)	30µL	120µL	180µL

※約 1 時間程度脱気させる(TEMED を加える前)。

A-8-2 ゲルストリップの膨潤

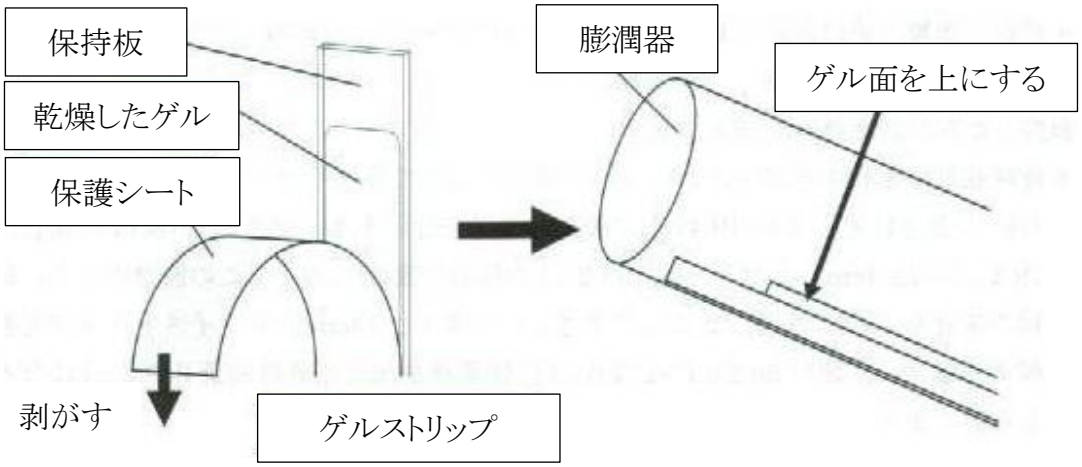
<使用器具・試薬>

- 膨潤液
- Immobiline DryStrip pH4-7NL, 18cm (17-1233-01/GE)
- ピンセット
- ゲルストリップ膨潤器 (3600-14/anatech)
- シリコン栓 (3600-14/anatech)
- クールホレスターIPG-IEF Type-PX (3650-01/anatech)

<操作>

① グルストリップ膨潤器の片側にシリコン栓をし、膨潤液を1本につき約5mL入れる。

② ゲルストリップの保護シートをゆっくり剥がし、ゲル面を上にしてゲルストリップ膨潤器に入れ、シリコン栓で封をする。この時にゲル面に傷をつけないように注意する。傷をつけると電気泳動パターンの乱れになる。



③ クールホレスターIPG-IEF Type-PX のプレートの上にクールシートを敷き、ゲルストリップの入ったゲルストリップ膨潤器を置く。ゲルストリップが膨潤液に完全に浸かっている事を確認し、ゲルストリップ膨潤器が転がらないように注意する。

*クールホレスターIPG-IEF Type-PX で電気泳動を行っている場合は、インキュベーター内などを使用して20℃の条件下で膨潤させる。

④ クールホレスターIPG-IEF Type-PX の電源を入れる。

⑤ 温度入力キーを使い、設定温度を20℃に設定する。

*温度コントローラーの上部はプレートの現在温度を表し、下部は設定温度を表す。プレートが設定温度になるまでには数分かかる。
*室温は設定値温度の±10℃の範囲になるように空調する。

⑥ 設定温度を 20℃一定のままにし、ゲルストリップの膨潤が十分になるまで一晩静置する。
*膨潤時間は最短で 8 時間、最長で 24 時間にする。
*膨潤したゲルストリップは保存ができないため、用事調整すること。

<補足>

濃度の薄い試料液を泳動する場合、またはアプライする試料の量を増やしたい場合には、ゲルスウェリングチャンバー(購入が必要;商品番号:3070-00)を使用して、膨潤と同時に試料を添加する方法が存在する。
ただし、プロテアーゼを含む試料などには試料塗布用ろ紙によるアプライ方法の方が良い。また、SDS を含んだ抽出液で調整したサンプルでは以下の方法ではできない。

① 膨潤液を調整する。
② 試料を調整する。(試料調整方法は後述)
③ 調整した試料に膨潤液を加える。
*最終液量はゲルストリップの長さにより異なる。
1cm の長さに対して約 19.4μL の液量で膨潤を行う。例えば、18cm の場合では、19.4μL×18(cm)となり、約 349.2μL の溶液で膨潤させる。この液量のうち、試料の割合を 1/6 から 1/2 にする。つまり、18cm のドライストリップを膨潤する場合は、試料 58.2μL ~ 174.6μL に膨潤液を加えて最終液量 349.2μL になるようにする。
④ 膨潤液を加えた試料をゲルスウェリングチャンバーに入れる。
⑤ ゲルストリップの保護シートを剥がし、ゲル面を下にしてその上に置く。
⑥ ゲルストリップの両端からシリコンオイル 1.5mL ほどゆっくり注ぎ、空気から完全に遮断する。
⑦ 蓋をしてゲルスウェリングチャンバーをインキュベーターの中に置き(設定温度 20℃)、静置する。
⑧ 設置値温度を 20℃一定のままにして、ゲルストリップの膨潤が十分になされるまで一晩静置する。膨潤時間は最短で 8 時間、最長で 24 時間にする。
*膨潤時に使用したシリコンオイルは再利用不可。

A-8-3 細胞からのタンパク抽出方法

<使用器具・試薬>

- アシストチューブ
- 超音波粉砕機
- 超速遠心機
- Ice

<操作>

① 空のアシストチューブの重量を測定する。
② 培地を除いて、氷冷した PBS 1mL で 1 回容器内壁を洗浄する。
③ 洗浄した PBS を捨て、新たに PBS を 1mL 入れた状態で、氷上でセルスクレーパーなどを用いて細胞を掻き集め、アシストチューブへ移す。
④ 5000rpm、4℃、5 分間遠心する。
⑤ 遠心後、出来るだけ完全に上澄みの PBS を除き、細胞の質重量を量る。(この時点で一回限り凍結保存してもよい。)
⑥ 細胞の湿重量に対して 4 倍量のタンパク抽出液を加えて、氷冷下で超音波破砕する。
⑦ 15000rpm、4℃、20 分間遠心を行い、上清を採取し、これを試料とする。

<試料の調整の注意点>

*試料を調整したら 1 時間以内に等電点電気泳動を行う方が良い。
*タンパク定量を行う場合は、等電点電気泳動を行った後に残った試料で定量を行うと良い。
*試料によっては抽出物の状態で保存したものを使用すると、超低温条件下で保存した場合でも再現性が得られない場合がある。保存するときは、組織、細胞など破砕をする前の状態で凍結保存すると良い。

A-8-4 等電点電気泳動(一次元目)

<使用器具・試薬>

- クールホレスターIPG-IEF Type-PX (3650-01/anatech)
- クールシート (3650-08/anatech)
- トレイ (3650-03/anatech)
- 電極 (2 個) (3650-04/anatech)
- ゲルストリップ保持版板 (3650-10/anatech)
- 低粘度シリコンオイル (3600-11/anatech)
- 電極用ろ紙 (3600-12/anatech)
- 試料用ろ紙 (3600-13/anatech)
- 試料ろ紙押え用アタッチメント (3650-18/anatech)
- 高電圧用セフティカバー付きコード (赤・黒) (3202-05/anatech)
- パワーホレスター Pro3900 (3900-01/anatech)
- Immobiline DryStrip pH4-7NL, 18cm (17-1233-01/GE)
- ゲルストリップ膨潤器 (3600-14/anatech)
- ピンセット

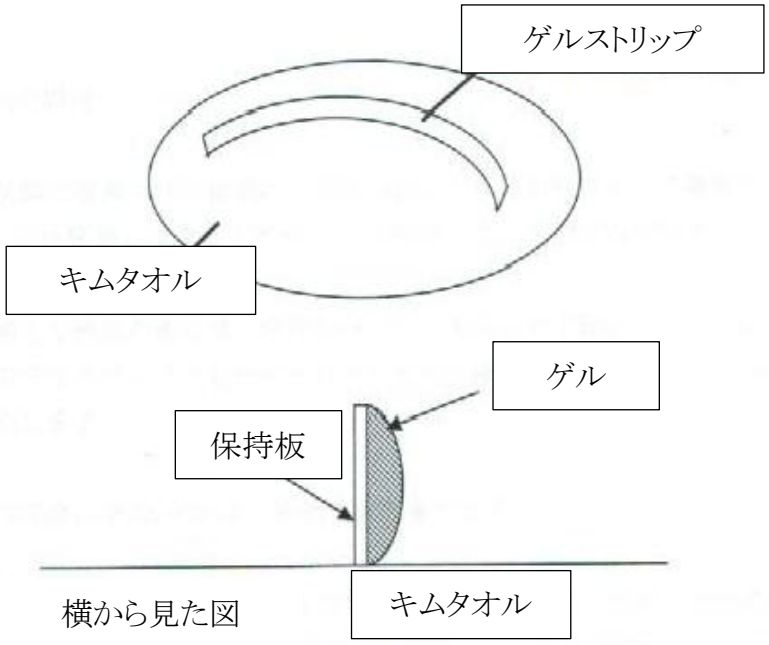
<操作>

① クールホレスターIPG-IEF Type-PX の電源を入れ、設定値温度を 20℃に設定する。
*温度コントローラーの上部はプレートの現在値温度を示し、下部は設定値温度を示す。温度が設定温度になるまでには数分かかる。

② クールホレスターIPG-IEF Type-PX のプレートの上にクールシートを敷き、トレイを置く。トレイのつまみが赤色の方が左側に来るようにし、黒色が右側に来るように置く。

③ トレイに少量のシリコンオイル(大気と遮断目的)を入れ、ゲルストリップ保存板をセットする。
*この時、ゲルストリップ保存板とトレイ底面の間には空気を残さない。

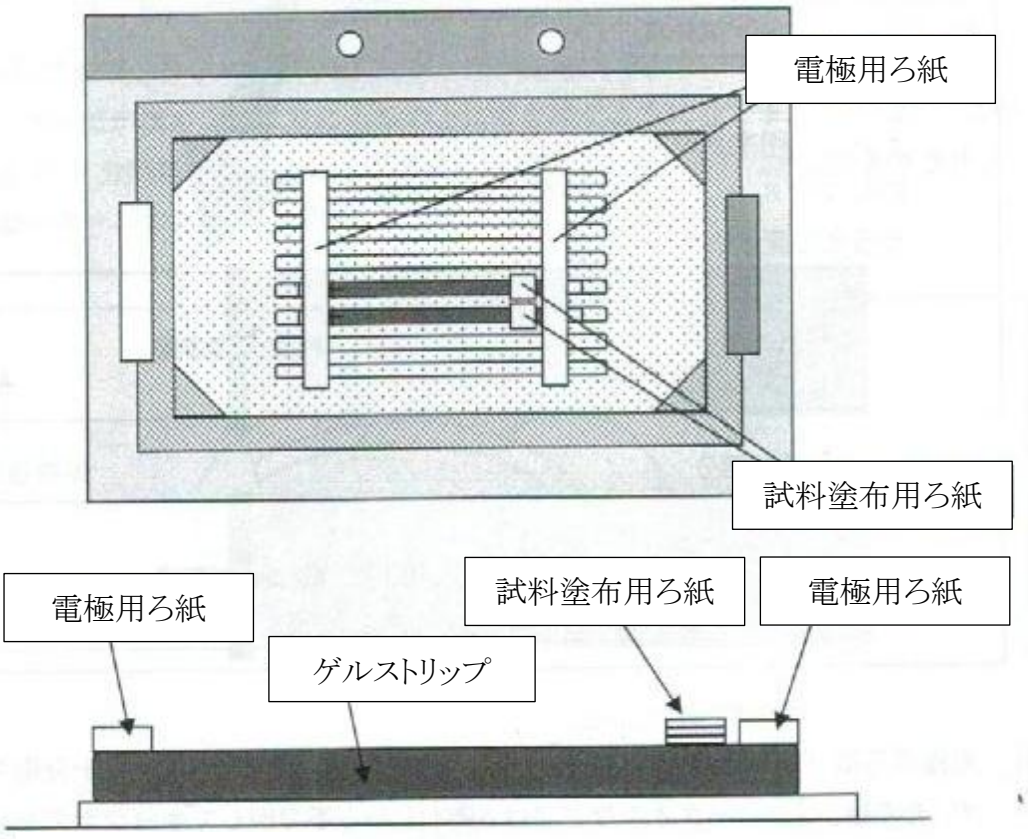
④ 膨潤済みのゲルストリップを膨潤器からピンセットで取り出し、平らなろ紙またはキムタオルなどの上にゲル面が横を向くように弧を描くように立てる。この状態で、必ず 60~90 秒静置し、余分な膨潤液を取り除く。
*ゲルと取り出す時にはゲル面が膨潤器に触れないように注意する。
*余分な水気があると電気泳動パターンの乱れの原因となる。



⑤ ゲルストリップをゲルストリップ保持板の溝にゲル面が上向きになるように置く。
*ゲルストリップには向きがあるので、＋と印字されている方が左側(陽極側)に来るようにする。
*トレイにはドライストリップの長さに合わせた印があるので、目安にする。
*2 本の場合はゲルストリップ間を 1 本分空けておき、左ゲル端を揃えて置く。
⑥ 電極用ろ紙を 2 枚用意し、Milli-Q をたっぷり均一に染み込ませた後、キムワイプなどに電極用ろ紙を挟み、上から軽く押さえて Milli-Q を取り除く。キムワイプ内の電極用ろ紙の位置を変えて、同じ作業を 4~5 回繰り返す。
*水気が多いと、電気泳動パターンの乱れの原因となる。
⑦ 電極用ろ紙をゲルストリップのゲル部分の両端にセットする。
*電極用ろ紙はゲルが半分かかる状態でセットする。
*ゲルストリップが 2 本と少ないときは、電極用ろ紙を半分に切り使用することが可能。
⑧ 試料をパラフィルムの上に置いた試料塗布用ろ紙に染み込ませる。この時に全ての試料が染み込むように 1 度試料塗布用ろ紙をひっくり返す。

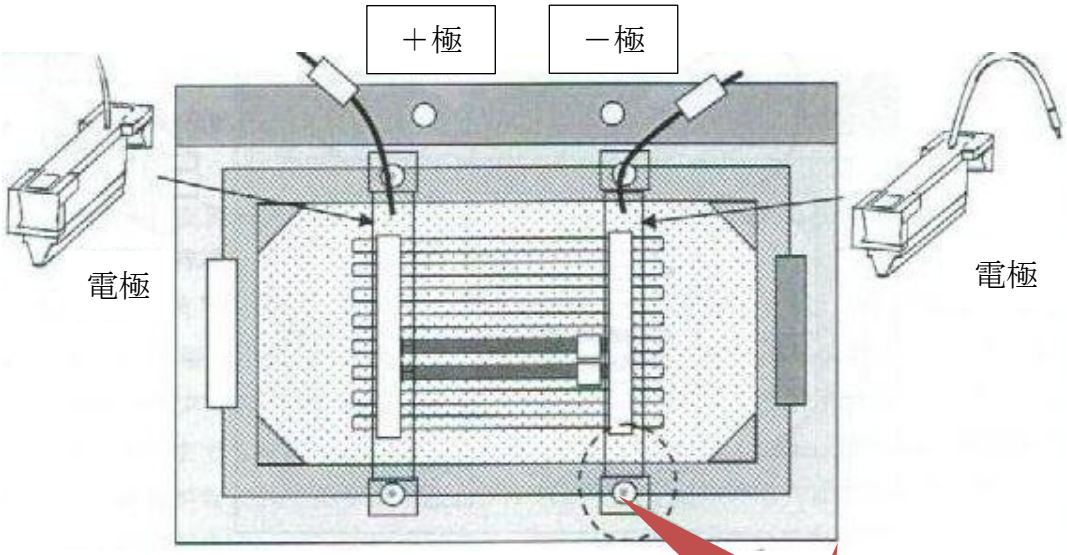
試料塗布用ろ紙 1 枚あたり 18μL の試料を染み込ませることができる。
*アプライしたい液量が少量で試料塗布用ろ紙が乾きすぎている場合は、膨潤液か抽出液を加えて、試料塗布用ろ紙 1 枚あたり 18μL になるようにする。

⑨ ピンセットで右側(陰極側)の電極用ろ紙から 1mm ほど離したゲルストリップの上に載せる。
*試料が 18μL を超える場合は試料塗布用ろ紙を同じ位置に最大 3 枚重ねて使用することが可能。この場合は最大 54μL アプライできる。
*複数の試料をアプライした場合には、どのゲルストリップにアプライしたかが分かるようにトレイの側面や装置の蓋などにラベルを張る。

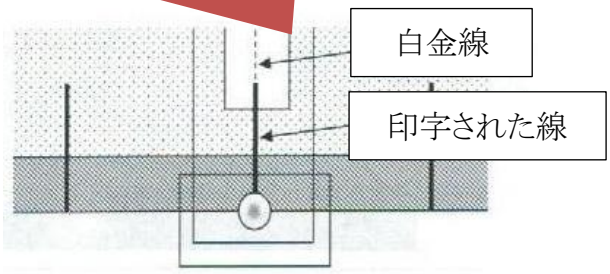


横から見た図

⑩　電極を取り付ける。電極は両手で持ち、電極用ろ紙の真ん中に電極が来るようにゆっくりトレイに取り付ける。電極を軽く押さえ、密着させる。
*上から電極を見て、中央に電極がセットされていることを確認する。



*電極をまっすぐにすること。トレイに印字された線と電極下部についている白金線の位置をそろえると、大体電極用ろ紙の真ん中に来る。



横から見た図

⑪ 左の電極リード線を泳動槽本体の“＋(赤)”差込口に、右の電極リード線を泳動槽本体の“－(黒)”差込口にそれぞれ差し込む。

⑫ 試料塗付用ろ紙が浮き上がるのを防ぐため、試料をアプライした側の電極に試料塗布用ろ紙押え用アタッチメントを載せる。試料塗布用ろ紙押え用アタッチメントが試料塗布用ろ紙をしっかりと押えるようにするために、ピンセットで試料塗布用ろ紙と接している部分を軽く押さえる。

⑬ トレイにシリコンオイルを約 150mL ~ 200mL 流し込む。この時に側面から見て、試料塗布用ろ紙、電極用ろ紙、ゲルストリップがシリコンオイルに浸かっていることを確認。

*ゲルストリップの乾燥を防ぐため、また試料塗布用ろ紙、電極用ろ紙、ゲルストリップを空気から遮断するため。これを怠ると、3500V の電圧がかかるためゲルが蒸発し、過電流が流れるので、危険である。

⑭ 泳動装置の蓋を閉じ、パワーホレスター Pro3900 を高電圧用セフティカバー付きコードで接続する。

*蓋が開いていると通電しない。

⑮ パワーホレスター Pro3900 の電源を入れ、ゲルストリップに合ったプログラムを確認する。

プログラムにない場合は、Menu → Opt → S-G → 18cm → 3-10 → 3500V → プログラムの保存先(1-9 まである)からプログラムを組む。プログラムは以下に記す。

⑯ パワーホレスター Pro3900 の Run ボタンを押して、等電点電気泳動を開始する。

<プログラム>

ステップ	モード	設定電圧	設定電流	時間
1	V	500V	250mA	2:00M
2	SG	3500V	2mA	6:00M
3	SV	3500V	2mA	10:00M
4	SV	3500V	2mA	∞

定電圧で等電点電気泳動が行われた場合、合計 18 時間＋ホールド時間

もしくは

ステップ	モード	設定電圧	設定電流	時間
1	V	500V	250mA	2:00M
2	SV	700V	2mA	1:00M
3	SV	1000V	2mA	1:00M
4	SV	1500V	2mA	1:00M
5	SV	2000V	2mA	1:00M
6	SV	2500V	2mA	1:00M
7	SV	3000V	2mA	1:00M
8	SV	3500V	2mA	1:00M
9	SV	3500V	2mA	∞

定電圧で等電点電気泳動が行われた場合、合計 18 時間＋ホールド時間

*モードの説明

V:定電圧モード。定電圧で泳動を行う場合に選択。

C:定電流モード。定電流で泳動を行う場合に選択。

W:定電力モード。電圧値、電流値、電力値の 3 つの値の上限を決定し、その上限を越えないように泳動を行う場合に選択。

SV:セフティ定電圧モード。電流値のリミッター値を設定して、“定電圧”で泳動を行う場合に選択。設定した電流のリミッター値に達して 5 秒が経過すると自動的に Pause 状態になる。

SC:セフティ定電流モード。電圧値のリミッター値を設定して、“定電流”で泳動を行う場合に選択。設定した電圧のリミッター値に達して 5 秒が経過すると自動的に Pause 状態になる。

G:グラジェントモード。電圧値を直線的にあげて、もしくは下げて泳動を行うモード。前のステップで設定した電圧値をスタート点とし、入力した時間内に入力した電圧値まで上昇する。

SG:セフティグラジェントモード。電圧値を直線的にあげ、もしくは下げて電気泳動を行う場合に選択。電圧値を変化させて電気泳動を行うが、何らかの理由で電流値もしくは電力値が設定した値に達して 5 秒が経過すると、自動的に Pause 状態になる。

<注意>
等電点電気泳動を開始して、15 分ほど経過したら下記の 2 点を必ず確認すること。

① 電流値の確認。
理想的な電流値は、0~0.2mA である。電流値が高いとサンプルに含まれる塩濃度が高い可能性があり、15 分を経過しても 1mA を超える場合は電気泳動を続けるとゲルが焦げる可能性がある。(不純物が多くても電流値は高い。)

② ゲルストリップに含まれる BPB が“＋(陽極)側”に移動しているかを確認。
移動していない場合はセットに問題があり、電圧がゲルストリップに掛かってない可能性が考えられる。この場合は、電源の出力を止めてから再度ゲルと電極のセット部分をチェックすること。
*同じ試料をアプライしても色素(BPB)の移動の速度が異なることがあるが、これは電気泳動に影響することはない。

<補足>
○シリコンオイルの再利用
一次元目の等電点電気泳動に使用したシリコンオイルは下記の手順で処理し、2 回目以降のシリコンオイルとして使用可能である。

1. 使用後のシリコンオイルは透明の容器に移す。
*シリカゲルをいれるため、透明の方がよい。
2. 移したシリコンオイルにシリカゲル(青いビーズ状が良い)を底から 1cm ほどの高さまで入れて、一晩以上脱水を行う。
*一晩でなくても次回使用するまでこの状態で保存。
3. 次回使用する際にシリコンオイルをろ紙を使用して濾過し、ゲル片や埃などを取り除く。
4. 等電点電気泳動終了後、シリコンオイルは再び、シリカゲル入りの容器へ移す。
*次回の電気泳動に支障がなければ、繰り返し使用可能。繰り返し使用できる目安は約 600mL 使いまわして、50 回ほど使用可能だが、使用状況により異なる。
*不純物が多く混入した場合には使用しない。

A-8-5 ゲルストリップの SDS 処理とアルキル化処理

<目的>

SDS 処理は等電点電気泳動の次に行う SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のための前処理である。タンパク質を SDS 化し、分子量の違いで分離するのを助ける。アルキル化処理はポリアクリルアミドゲル中に含まれるモノマーのアクリルアミドがタンパク質を修飾するのを防ぐ。質量分析やプロテアーゼシークエンサーによるアミノ酸配列決定を行う場合はアルキル化を行う。

<使用器具・試薬>

- ゲルストリップ膨潤器　　(3600-14/anatech)
- SDS 処理液
- アルキル化処理液
- ピンセット

<操作>

① ゲルストリップの本数分の SDS 処理液、還元アルキル化処理液、Milli-Q のゲルストリップ膨潤器を準備する。
*2 サンプルなら計 6 本必要。

② SDS 処理液に DTT を加え、ゲルストリップ膨潤器に約 5mL ずつ入れる。

③ Milli-Q をゲルストリップ膨潤器に 9 分目まで入れる。

④ 一次元目のプログラムが終了していることを確認して、パワーホレスター Pro3900 の STOP を押して、停止後にパワーホレスター Pro3900 の電源を切り、念のため接続ケーブルも外す。
*都合がつかない場合はホールド状態でしばらく放置。

⑤ 電極をトレイから取り外し、ゲルストリップの上に載っている電極用ろ紙と試料塗布用ろ紙をピンセットで取る。試料塗布用ろ紙がゲルストリップに張りついて剥がれない場合は、付いたまま作業を続ける。SDS 処理を行うことで比較的剥がれやすくなるので、SDS 処理が終了してから剥がす。

⑥ ピンセットでトレイからゲルストリップを取り出し、Milli-Q を 9 分目まで入れた膨潤器のなかで 1 秒ほどシリコンオイルを洗い流す。
*トレイからゲルストリップを取り出す際には一度、トレイの淵にゲルストリップを置き、しっかりつかんだ後に膨潤器で洗う。この時にゲルストリップをキムワイプ等に落とし、ゲル面が付くと二次元目の電気泳動の乱れの原因となる。

⑦ ろ紙などの上にゲル面が上になるように約 10 秒置き、余分な水気を取る。
⑧ 用意しておいた SDS 処理液にゲル面が上になるようにゲルストリップを入れ、シリコン栓をする。この時に、ゲル面を膨潤器に当てて、傷つけないようにする。
*サンプル情報を記したテープをゲルストリップ膨潤器に張り付ける。
⑨ ゲル面が上になるように穏やかに 30 分間振とうさせる。
*止める際には、SDS 処理を 15 分行った後に凍結。解凍後は残りの 15 分から再開。凍結させる際には、乾燥しないようにラップなどに包み、-80℃で凍結させる。約 1 ヶ月間凍結可能。
*アルキル化を行わない場合は SDS 処理を 40 分行う。
⑩ SDS 処理の間に調整しておいたアルキル化処理液をゲルストリップ 1 本につき約 5mL 膨潤器に入れる。
⑪ SDS 処理が終わったらゲルストリップをアルキル化処理液にゲル面が上になるように入れ、シリコン栓をする。
*この時にサンプル情報を記したテープをアルキル化処理のゲルストリップ膨潤器に付け直す。
⑫ ゲル面が上になるように穏やかに 15 分振とうさせる。
⑬ ゲルストリップをピンセットで取り出し、SDS-電気泳動を行う。

A-8-6　SDS-電気泳動

<使用器具・試薬>

- 電気泳動槽(セフティカバー付き)　(3320-01/anatech)
- ゲルストリップ押えシャークコーム 200　(3068-39/anatech)
- 泳動用プレート(プレーン)　(3068-34/anatech)
- 泳動用プレート(ノッチ、スペーサー付き)　(3068-35/anatech)
- パワーホレスター　Pro3900　(3900-01/anatech)
- 高電圧用セフティカバー付きコード　(3202-05/anatech)
- スパチュラ

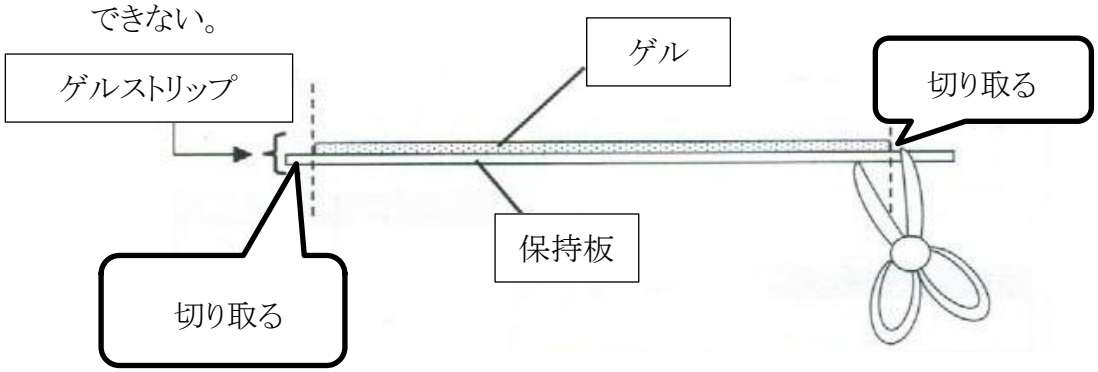
<前準備>

① 先述のポリアクリルアミドゲルを作製しておく。
② SDS-電気泳動用の泳動バッファーを約 2L 作製しておく。
③ 電気泳動槽は泳動バッファーがこぼれるのを防ぐため、トレイまたはバットの上で行う。

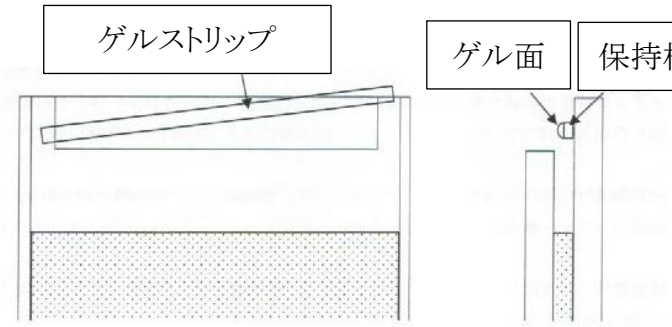
<操作>

1. 作製しておいたアクリルアミドゲルのガラスプレートについているサージカルテープ(下部の白いテープ)を剥がす。
   ポリエステル粘着テープ(黄色)は剥がさない。
   *サージカルテープは、ゲルメーカーを使用せず、ゲルを 1 枚で作製した時に必要なテープ。
2. 作製したアクリルアミドゲルを Milli-Q で洗浄する。
   *この時にゲル片などが残っているとゲルストリップをうまく密着させて載せることができないので、必ず取り除く。
3. 電気泳動槽にアクリルアミドゲルを差し込む。
   この時に、泳動プレートのノッチ側(切り込みの入っているガラス板)が内側にくるようにセットする。
   *泳動槽の下部には泳動用プレートを載せる部分があるので、そこに載るようにセットする。

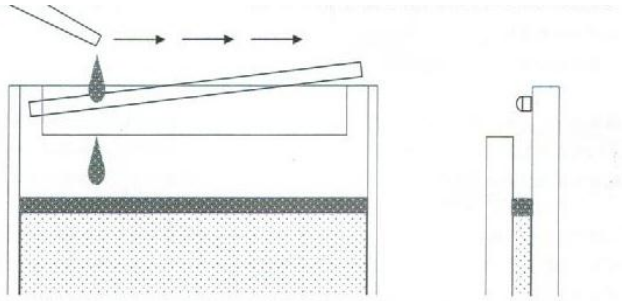
4. アルキル化処理が終了したゲルストリップの端をゲルストリップ膨潤器から出し、ゲルストリップ保持板の余分な部分をはさみで切り取る。
*スラブゲルは 19cm であり、アクリルアミドゲルは 18cm であるため載せることができない。



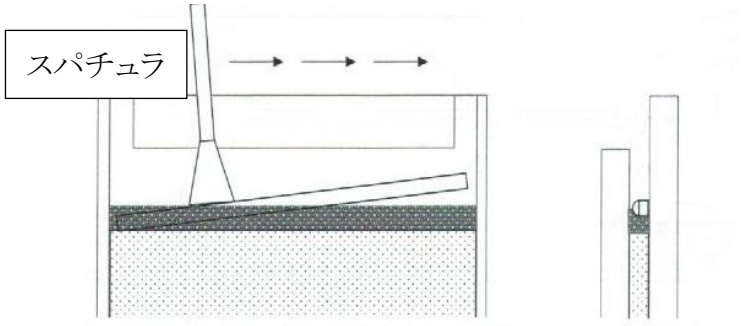
5. アクリルアミドゲルの上にゲルストリップのゲル面が内側になるように載せる。(下図参照。)



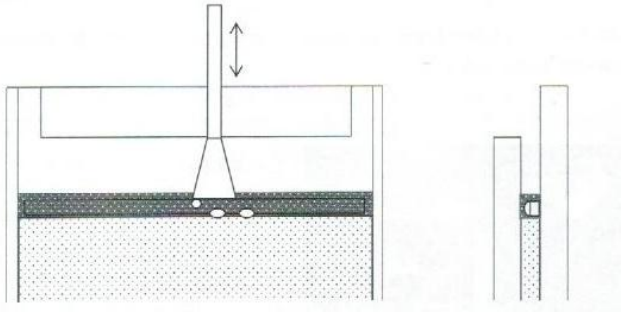
ゲルストリップの保持板部分を泳動用プレート(プレーン)に貼り付けるようにして置く。



ゲルストリップを滑りやすくするため、SDS-泳動バッファーもしくはゲルストリップの SDS 処理液をアクリルアミドゲルの上にピペットを使って 0.5mL ほど流しこむ。

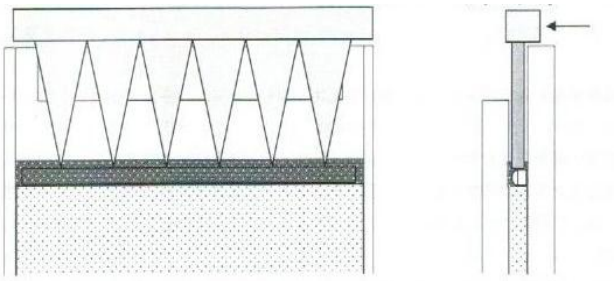


先の平らなスパチュラを使って、ゲルストリップをアクリルアミドゲルに密着させる。ゲルストリップの下に空気が入らないようにする。



ゲルストリップの下に空気が入ってしまった場合は、ゲルストリップの保持板をスパチュラで何度か上から押すことで、空気が浮き上がって抜ける。

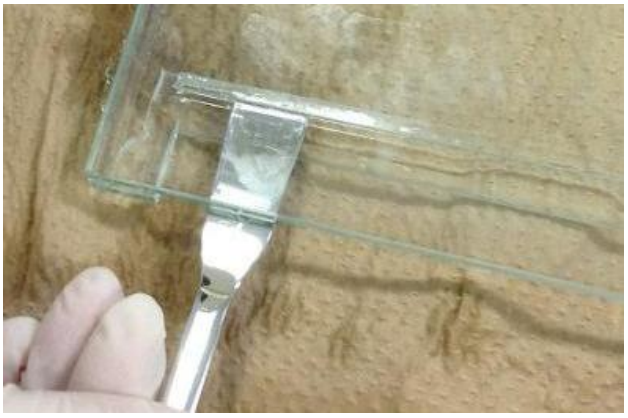
6. ゲルストリップ押えシャークコームをゲルストリップの上に軽く載せ、ゲルストリップが浮き上がらないようにする。この時にシャークコームが刺さらないように注意する。ほんの少し刺さった状態であれば大丈夫だが、数ミリ刺さった場合は場所を変え、置き直す。



7. 泳動用プレートを抑え込むために、泳動用プレート押え板を差し込んで固定する。
8. 陽極側バッファー層に 1/3 ほど泳動バッファーを注ぐ。
9. 泳動用プレートをセットした陰極側バッファー層を中にいれる。アクリルアミドゲルの下部に気泡がある場合は陰極バッファー槽ごと軽く上下に動かして、気泡を抜く。
10. 泳動バッファーを陽極側と陰極側の水位が同じ高さになるようにバッファーを満たす。
    *同じ高さにすると、水位が下がることがないので、泳動バッファーのリークを防ぐことができる。
11. パワーホレスター Pro3900 と泳動槽を高電圧用セフティカバー付きコードでつなぐ。
12. 定電圧で SDS-電気泳動を開始する。
    始めは 20mA / 枚で設定し泳動を行う。
    *この時、のちにシャークコームを取り除くことを忘れないように、あえて泳動槽のセフティカバーはしない。
13. 15~30 分経過し、ゲルストリップ中の色素“BPB”がアクリルアミドゲルに完全に移動していることを確認した後、パワーホレスター Pro3900 の Pause ボタンを押して、一時停止させる。
14. 一時停止させたら、“ゲルストリップ押えシャークコーム”を取り除く。

15. パワーホレスター Pro3900 の電流値を 30mA にして SDS-電気泳動を再開する。
    サーキュレーターにて冷却しながら泳動を行う場合は定電流 40mA / 枚で泳動が可能。
    *泳動中はジュール熱が発生するため、電流値を高く設定しない。最高でも 45mA / 枚で行う。あまり高く電流値を設定すると泳動装置の破損の原因となる。
    *泳動時間は室温やゲル濃度により異なるが、3 時間から 5 時間程度。
16. 3 時間から 5 時間後、BPB の青い線が泳動用プレートの下から約 1cm のところに移動したらパワーホレスター Pro3900 の Stop ボタンを押して電気泳動を終了する。
    *念のために接続コードを外す。
17. 泳動プレートを取り出す。
    *泳動プレートは泳動バッファーで滑りやすくなっているので慎重に行う。また、Milli-Q で洗浄すると滑りが緩和される。
18. ポリエステル粘着テープ(黄色)を剥がし、切り込みの入っている方の泳動用プレート(ノッチ側)を下にして綺麗なキムタオルの上に置く。
19. スパチュラを使い、泳動プレートの間に差し込み、テコの原理を利用し、泳動プレート(プレーン側:正方形のガラス板)を外す。

    *この時にスパチュラを入れる場所が端すぎると切れ込みの入っているガラス板が割れるので、必ず少し中で行う。

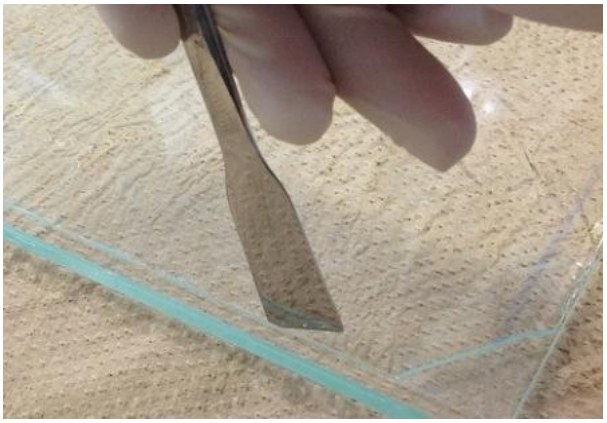


20. 塩基性、酸性が分かるようにアクリルアミドゲルの“＋側:酸性側”の下を斜めに切り落とす。
    *切り落とすところは必ず酸性側の下にすること。
21. 一次元目のゲルストリップをアクリルアミドゲルから外す。

22. 泳動プレート(ノッチ側)にアクリルアミドゲルが張り付いているので、アクリルアミドゲルの左右の部分に丁寧に切り込みを入れる。

*切り込みを入れる際に裂け目ができるとそこからゲルが避けてしまうので、丁寧に扱う。

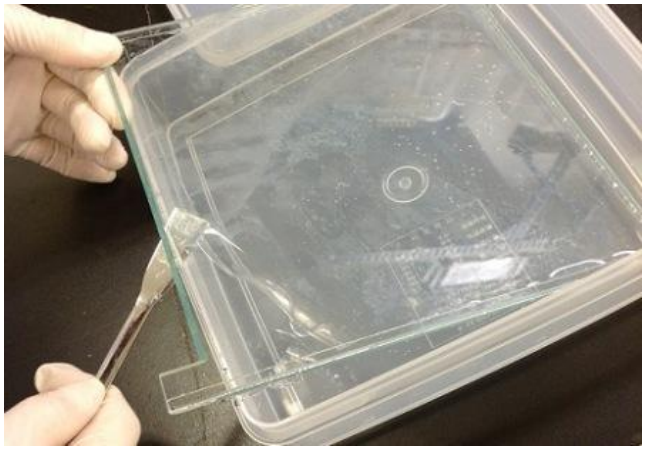
*押して切って進むというイメージでゲルの両端に切れ込みを入れる。



23. 染色・脱色用タッパーに固定液を入れて、慎重にアクリルアミドゲルを移して、染色作業へ移る。

*ゲルをタッパーに移す際にはゲル自身の重みでタッパーへ入れるようにする。
*写真のように少しだけゲルと泳動プレートに空気を入れると、ゲルは自然にタッパーに落ちていく。

*スパチュラの角でゲルを傷つけないよう注意する。



<補足>

○分子量マーカーの使用

<前準備:アガロースゲルの作製>

① 0.2g のアガロースに 20mL の Milli-Q を 50mL ビーカーに入れてアガロースを可溶化させる。
*正確に作製する必要はない。

② 電子レンジで透明になるまで溶かして、室温まで冷めてから上部にサランラップ等をかけて輪ゴムで止め、4℃で保存する。(2 年間は保存可能)
ふた付き容器でも良いが、ふたを付けたまま電子レンジをかけると容器が破損するので、ビーカーを使用。

<分子量マーカーの作製・アプライ>

① パラフィルム上に試料塗布用ろ紙を半分に切って載せる。
② 分子量マーカーを 9μL、ろ紙に塗布する。
③ アガロースを溶かして、1000μL ピペットで吸い上げ、1 滴滴下する。
④ アガロースが固まるまで静置する。
⑤ ゲルストリップの両端のゲル部分を 3～5mm 切り落とす。
⑥ ゲルストリップをスラブゲル上面にセット後、アガロースを塗布したろ紙を端にセットする。
ろ紙は、側面のスペーサーから 5mm 程離れた位置にセットする。(近過ぎると側面に流れるので注意。)
⑦ シャークコームをセットし、電気泳動を開始する。

*アガロースを溶かす際には、吹きこぼれやすいのでこまめに電子レンジを止めてビーカーを撹拌し、温める。
*1000μL ピペットで滴下後にチップに残っているアガロースはビーカーに戻す。
*分子量マーカーは、作り置きしない。
作製自体は 5 分程なので、SDS 処理の間で十分間に合う。
*作って時間を置き過ぎるとアガロースの膨らみが小さくなって、バッファー上面に浮き易くなるので注意。
*分子量マーカーは、酸性側・塩基性側のどちら側にセットするかを決めて統一する。

A-8-7　Flamingo による蛍光染色

<使用器具・試薬>

- Flamingo ゲルステイン　(Invitrogen, 161-0491)
- タッパー
- Methanol　(WAKO)
- 酢酸
- Milli-Q

<試薬の組成>

固定液

- Methanol　250mL(最終濃度 50%)
- 酢酸　50mL(最終濃度 10%)
- Milli-Q　200mL

染色液

- Flamingo(×10)溶液　40mL
- Milli-Q　360mL

<操作>

① 固定液 250mL/ゲル 1 枚の割合で、タッパーに入れ 30 分振とうさせる。
② Milli-Q250mL/ゲル 1 枚の割合で、3 回洗浄する。
③ 10 倍希釈した染色液を、200mL/ゲル 1 枚の割合で、タッパーに入れ、1 時間振とうさせる。(染色液が遮光性なため、タッパーはアルミホイルで十分に遮光する。)
④ 染色液を遮光した容器に回収後、Milli-Q 250mL/ゲル 1 枚の割合で、1 回洗浄する。
⑤ ゲルの乾燥を防ぐ為、ゲルをクリアファイルに挟み、挟み口を濡らしたキムワイプで包む。
⑥ ジップロックの様なフリーザーバックに入れ、脱イオン水を適量入れて、乾燥しないようにする。(ゲルが数枚ある場合は、各ゲルにサンプル名を記載したテープを張り付ける。)
⑦ ゲルの露光を防ぐため、ゲルの入ったフリーザーパックをゲル運搬用の箱へ入れる。
⑧ 遺伝子実験施設の蛍光撮影機により、スポットの検出を行う。

A-8-8 画像解析

○フルオロホレスター3000　Ver3.1

フルオロホレスター3000　Ver3.1 は蛍光染色された二次元電気泳動ゲルの画像撮影を高感度で行い、その画像データから必要なスポットを選択し、切り出し作業(手動作業)までを行う装置である。

<操作>

① フルオロホレスター3000 Ver3.1 の本体側面の電源を入れる。

② パソコンのフルオロホレスター3000 のソフトウェア（FL3000　Ver3）を起動する。

*接続ステータスが、“未接続”の場合は、“接続”状態にしてください。

*ソフトウェアの上部メニューバーの“設定”から“環境設定”をクリックし、以下のように設定する。

*設定した値は保存されるので、再度の設定は必要ない。

CCD カメラの温度設定：撮影には 10℃を推奨。 *室温が高い場合は室内を冷房にする。 撮影台からの距離　：ゲルサポートプレート（透明アクリル板　厚さ 2mm）の上にゲルを乗せてスポットの切り出しをするために、2mm に設定する。

③ 使用目的に合わせたプレートに蛍光染色したスクラブゲルを乗せる。

・画像解析用の画像を撮影する場合

ゲル撮影用プレート（黒色アクリル板）の上にスクラブゲルを乗せる。泡が画像に写り込まないように、スラブゲルの下に挟まった泡を押し出す。

・スラブゲルからの切り出しを行う場合

ゲルサポートプレート（透明アクリル板）の上にスクラブゲルを乗せる。泡が画像に写り込まないように、スラブゲルの下に挟まった泡を押し出す。

*ゲルサポートプレートが反っている場合は新しい物を使用する。

④ プレートの上に、マスクシート（黒色ロの字型シート）を被せる。

*マスクシートは光を反射しない均一にザラザラした方が表。マスクシートはプレートからの反射光を低減し、バックグラウンドを抑えられる。

⑤ スラブゲルを乗せたプレート本体内部の撮影台の上に設置し、奥の左右にあるネジでマスクシート及びプレートを固定する。

⑥ 本体内部の左右にあるランプユニットを回転させて、蛍光色素に対応するランプ（LED）をスラブゲルへ向ける。

Blue と Green のランプ：SYPRO Ruby、Flamingo ゲルステイン、
Pro-Q Diamond、Pro-Q Emerald
UV(375nm)のランプ　：Phospho QUANTI

*ランプの基盤ユニットを交換する場合は、本体の電源を切ってから交換作業を行う。

⑦　蛍光色素に対応したフィルターをセットする。

SYPRO Ruby　：ランプはフィルター無

※550nm ショートパスフィルター付きでも撮影は可能

CCD カメラに 580nm ロングパスフィルター

Flamingo ゲルステイン　：ランプユニットに 550nm ショートパスフィルター

※ランプユニットにフィルターが無くても撮影は可能

CCD カメラに 580nm ロングパスフィルター

Pro-Q Diaond　：ランプユニットに 550nm ショートパスフィルター
CCD カメラに 580nm ロングパスフィルター

Pro-Q Emerald　：ランプユニットに 490nm ショートパスフィルター
CCD カメラに 520nm ロングパスフィルター

Phospho QUANTI　：ランプユニットはフィルター無
CCD カメラに 440nm ロングパスフィルター

⑧　本体扉を閉めてパソコンのソフトウェアから操作する。

⑨　“蛍光ランプ”エリアから蛍光色素に対応するランプをクリックする。

SYPRO Ruby、Pro-Q Emerald　：Blue のランプ

Flamingo ゲルステイン　：Blue と Green(2 個)のランプ

※LED ユニットに 550nm のショートパスフィルターがない場合は、Blue のみ点灯

Pro-Q Diamond　：Green(2 個)のランプ

Phospho QUANTI　：UV(375nm)のランプ

⑩　“撮影”エリアの“露光時間”に撮影秒数を入力し、“撮影”ボタンをクリックしてスラブゲルを撮影する。撮影を止める場合は、“中止”をクリックする。

SYPRO Ruby 染色画像の取り込み時間の目安	：5～15 秒
Flamingo ゲルステイン染色画像の取り込み時間の目安	：3～10 秒
Pro-Q Diamond 染色画像の取り込み時間の目安	：60～120 秒
Pro-Q Emerald 染色画像の取り込み時間の目安	：120～240 秒
Phospho QUANTI 染色画像の取り込み時間の目安	：1～5 秒

*サンプル量、蛍光染色液のコンディションにより適切な露光時間は異なる。

*撮影した画像がサチュレーション(Saturation)を起こしているか確認する事ができる。撮影したスラブゲル画像の右上にある“サチュレーション(Saturation)”

をクリックすると、サチュレーションを起こしている位置が赤く表示される。

⑪ 撮影した画像は、必要に応じて“画像調整”エリアにて編集する。

⑫ 保存する画像形式・大きさ等に対応“保存”を選択してスラブゲル画像を保存する。

*ProgenesisPG200 での画像解析には、“8bit TIFF 画像”を推奨。

➢ 全体画像の保存:上部メインメニューの“ファイル”からの保存方法

・保存(○○○○ 撮影画像):8bit TIFF または 16bit TIFF または(8bit)BMP フォーマット保存される。

*保存される画像には、白黒反転、強調処理などは反映されるがポイントの位置情報、画面の拡大縮小は反映されない。

・保存(BMP 画像イメージ):BMP フォーマットで保存される。

*保存される画像には、白黒反転、強調処理、ポイント位置情報、画面の拡大縮小までの反映された画像で保存される。

➢ 範囲指定の保存:スラブゲル画像の左上にある“動作モード”からの保存方法

・範囲保存 ○○○○ :8bit TIFF または 16bit TIFF または (8bit)BMP フォーマットで保存される。

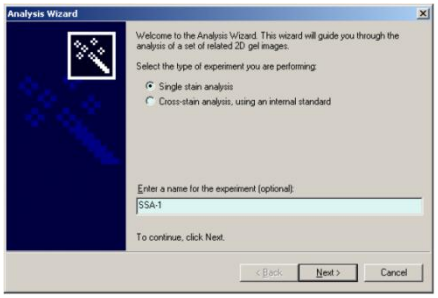
○Progenesis PG200/PG220

Progenesis は二次元電気泳動ゲル画像を比較して、ディファレンシャルなタンパク質スポットを判定する為の解析ソフトウェアである。

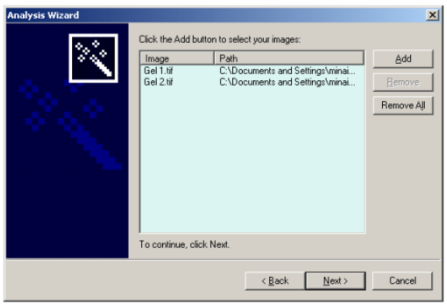
<設定手順>

① Progenesis PG200/PG220 を起動する。

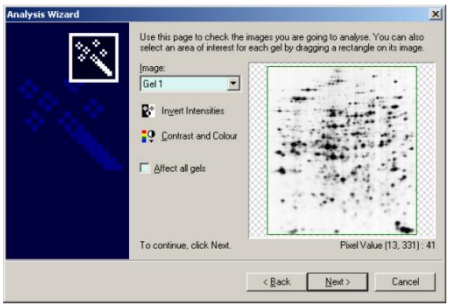
② Single stain analysis 実験を選択し、実験名(日付でも良い)を入力し、Next をクリックする。



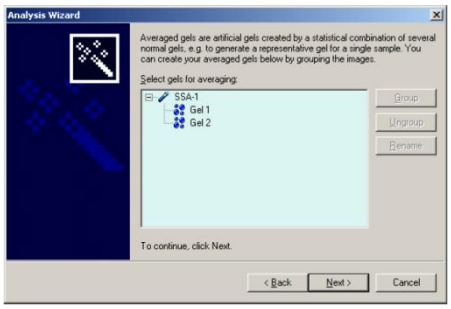
③ 画像を選択する。Add ボタンをクリックするとファイル選択画面が開き、必要な画像を選択し、Next をクリックする。



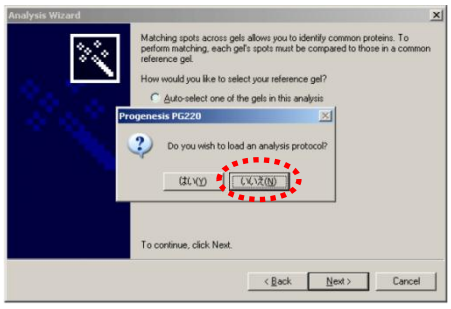
④ ゲル画像がプレビューされ、解析する範囲を選択し、Next をクリックする。(2 枚目の画像は Image プルダウンメニューから表示させることができる。)



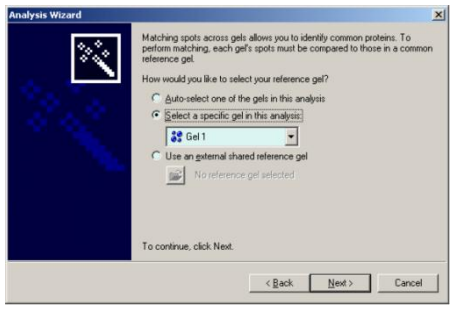
⑤ 平均化画像を作成するウィザードが開かれるが、2 枚の画像比較の場合は何もせずに Next をクリックする。



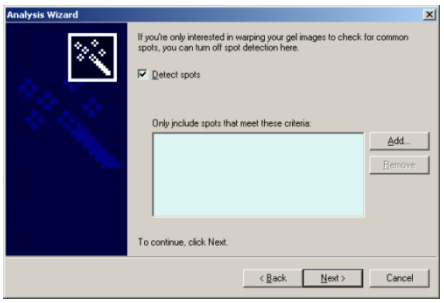
⑥ 解析 Protocol をロードするかどうかのアラートが表示されるが、ここではロードせずに No を選択した後、Next をクリックする。



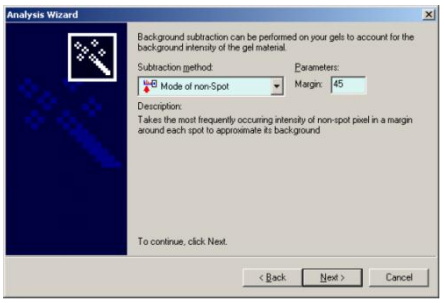
⑦ リファレンス画像を選択し、Next をクリックする。



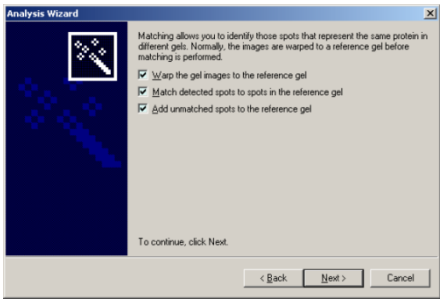
⑧ スポット検出にチェックを入れ、Next をクリックする。



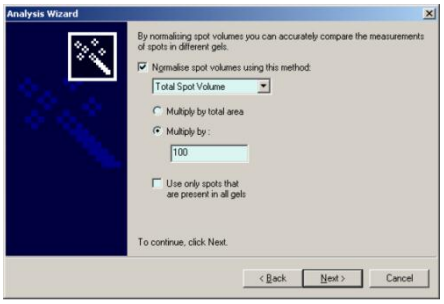
⑨ バックグランド差分の手法を選択するが、ここではデフォルトで選択されている手法ならびにパラメーターをそのままにし、クリックする。



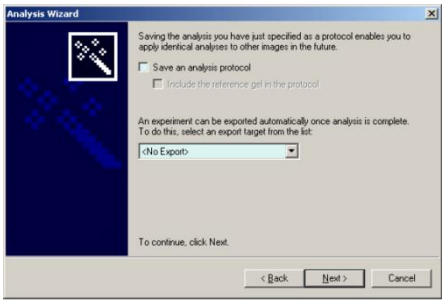
⑩ ワーピングとマッチングの確認を行うため、いずれもチェックが入っていることを確認し、Next をクリックする。



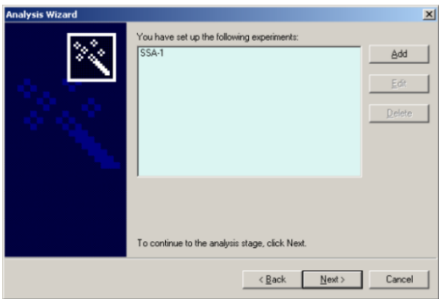
⑪ ノーマライゼーションの手法を選択するが、ここではデフォルトで選択されている手法ならびにパラメーターをそのままにし、Next をクリックする。



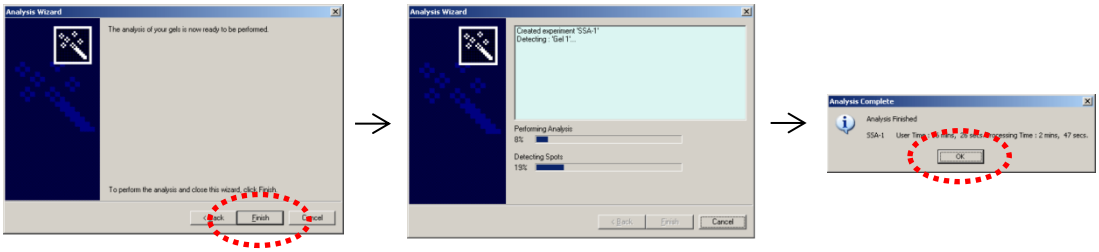
⑫ 解析プロトコルの保存を確認するウィザード画面が表示されるが、ここでは保存しないのでチェックを入れずに Next をクリックする。



⑬ 設定した実験に加え、必要ならば他の実験も加えることができるが、ここでは設定した実験のみ実施するので選択せずに Next をクリックする。



⑭ ウィザードの最後の画面が表示され、Finish をクリックし、自動解析を実行する。



<画像解析>

ここでは自動解析後の基本的な表示とスポット編集について取り上げる。詳細は「Progenesis PG200/PG220 操作説明書」に記載。

内容

A)ソフトウェアインターフェイスの概要

⬇

B)スポット比較(ワーピングの確認)

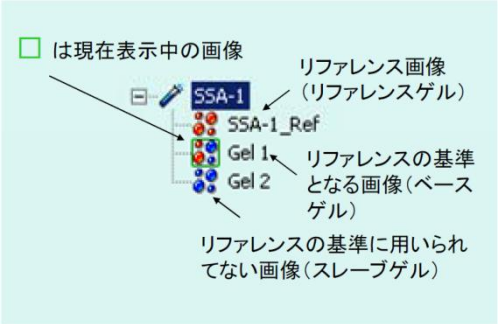
⬇

C)スポット編集(スポット数の確認)

操作

A) ソフトウェアインターフェイスの概要

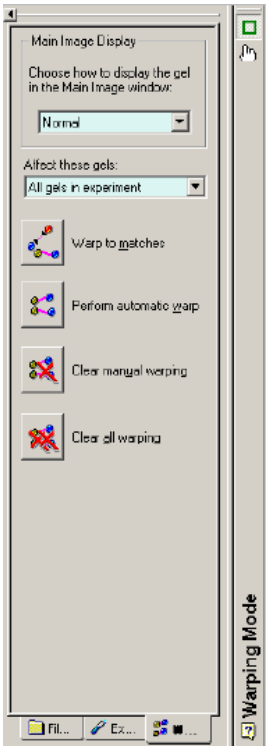
- ✓ 解析ウィザードによる自動解析が終了すると解析が表示され、画像の左側にはナビゲーターがあり、実験ビュータブをクリックすると実験構成を確認できる。
- ✓ 実験ビューに表示されるアイコンを右図に示す。緑色の四角の枠は現在表示している画像を示している。

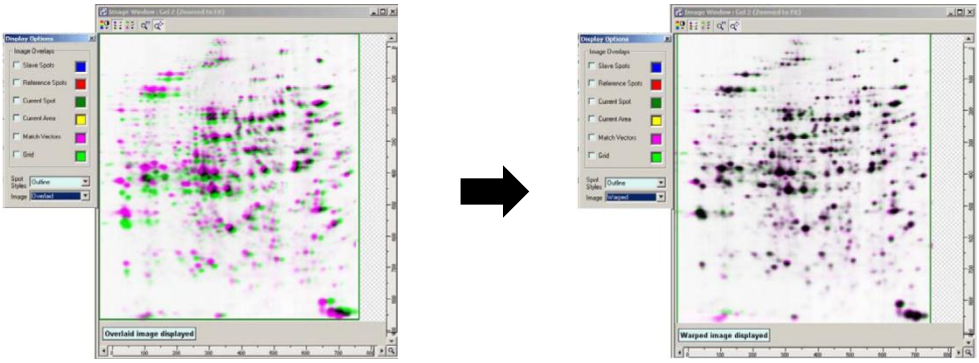


- ✓ メニューツールバーにはスポット編集ならびにスポット検出のためのツールが用意されている。またプログラムウインドメニューのセレクトバーはいずれもそれぞれ新しいウインドが開く。
- ✓ イメージウインドにあるズームフィットボタン をクリックすると、ウインドサイズに画像全体が表示される。

B) スポット比較(ワーピングの確認)

1. メインツールバーのワープゲルボタンをクリックするとナビゲーターがワーピングモードに変わり、サブモードツールバーを確認することができる。
   *メインツールバーのイメージドロップダウンリストから画像表示を Gel 1 から Gel 2 に変更する。
2. 画像のイメージウインドツールバーにあるディスプレイオプションボタンをクリックするとダイアログボックスが表示され、現在表示されている項目にチェックが入っていることが分かる。
3. チェックを全て外し、イメージ表示をドロップダウンリストの Normal から Overlaid に変更すると現在の画像(Gel 2)が緑色に、リファレンス画像(Gel 1)が紫色に表示されるオーバーレイ表示になる。
   *灰色、もしくは黒になったスポットワーピングが成功したスポット、緑や紫のままのスポットは画像刊で違いのあったスポットである。

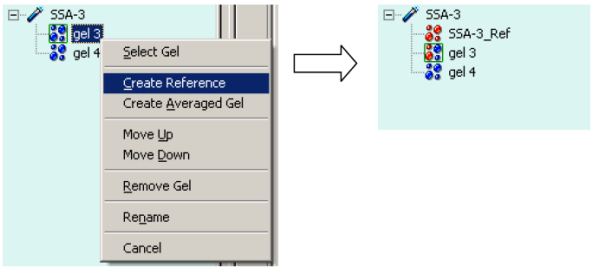




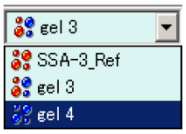
4. オーバーレイ表示およびワープ表示の色調を変更するには、イメージウインドツールバーにあるコントラスト&カラーボタン をクリックして調整できる。

<手動によるワーピング最適化>

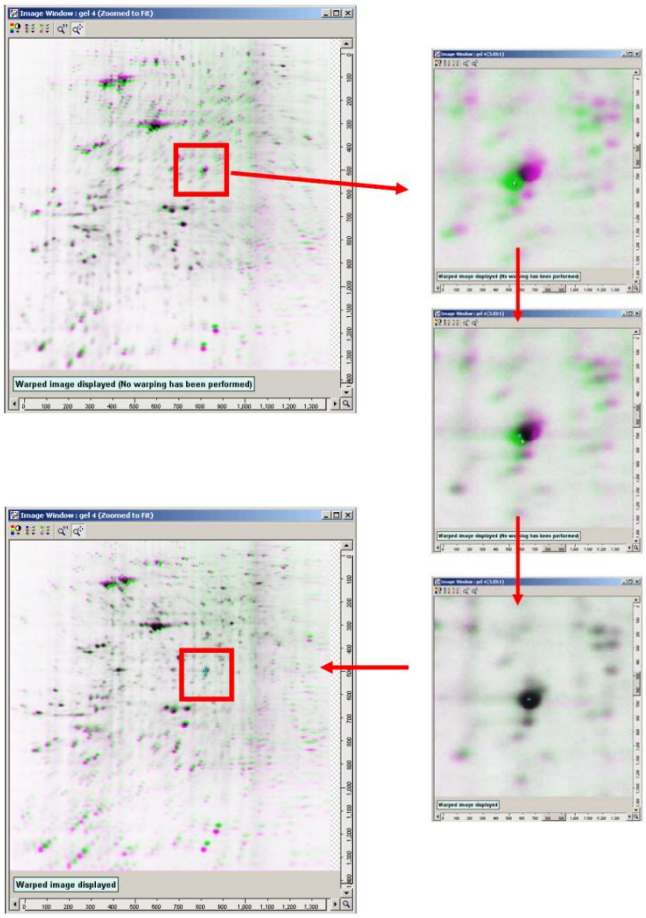
1. 解析ウィザードによる自動解析を行わない場合はリファレンスが存在しないので、リファレンス画像を作成する。Experiment タグの Gel 3 を右クリックし、Create Reference を選択し、リファレンス画像を作成する。



2. ワーピングボタン をクリックしワーピングモードに入る。
3. 表示画像は Gel 4 を選択した後、ナビゲーターの Main Image Display を Warped に変更し、Affect these gels はドロップダウンリストから Current gel を選択する。



4. サブモードツールバーから手動ワーピングボタンを選択する。
5. カーソルアイコンが緑色の矢印に変わり、ドラッグ&ドロップでランドマークを設定できるようにする。
6. ズームツールを使用し、選択範囲を拡大表示する。
   *緑色が現在のゲル画像で、紫色がリファレンス画像
7. 緑色のスポットをドラッグし、対象のスポットを少し移動させると、その他の緑色のスポット全てが移動する。目的のリファレンスの位置でマウスボタンを離しドロップすると青い十字(ワープベクター)がランドマークとして表示される。
   *Zoom to Fit ボタン で画像全体を表示することができる。



C) スポット編集(スポット数の確認)

1. 左上の Edit を選択し、Chose reference gel を選択する。
2. ツールバーの Create a new gel を選択し、Next をクリック。
3. Gel の名前にスポット数が表示される。

<補足>

- 本電気泳動装置(Anatech 製品)は 2012 年 6 月に納品されたものである。
- 本 Protocol は Anatech の Protocol を基に本研究室用にアレンジしたものである。
- 更に詳細を見るときや、変更点がある場合は Anatech の Protocol (橙色の Protocol 4 部)を参照のこと。
  - Protocol 4 部
    - クールホレスター IPG-IEF Type-PX
    - コンスタントパワーサプライ パワーホレスター Pro3900
    - SDS-電気泳動装置 クールホレスター SDS-PAGE Dual-200K
    - SDS-PAGE 用ゲルメーカー 37/200、28/200、36/160
- また、タンパク抽出や画像解析等で分からないことがある場合は Anatech 株式会社の古賀正信に e-mail もしくは HP から(e-mail アドレスは以下)質問をするとよい。

Anatech 株式会社
営業部 古賀 正信
E-mail: koga-m@anatech.co.jp
URL: http://www.anatech.co.jp
Tel: 03-3812-8701
Fax: 03-3818-9167
〒113-0034 東京都文京区湯島 2-31-15

A-9. 統計処理

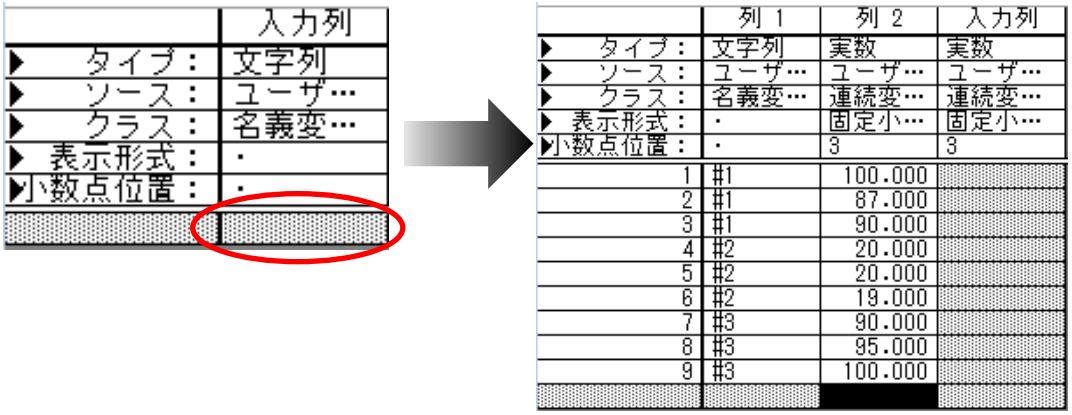
<操作手順>

①StatView-J 5.0 のファイル内にある StatView を起動する。

②新規データシート をクリックする。

③タイプを“実数”から“文字列”へ変更する。

④下図の赤枠内にサンプル名(ex.#1,#2,#3)を明記し、右の列 2 にデータを 1 つずつ入れていく。



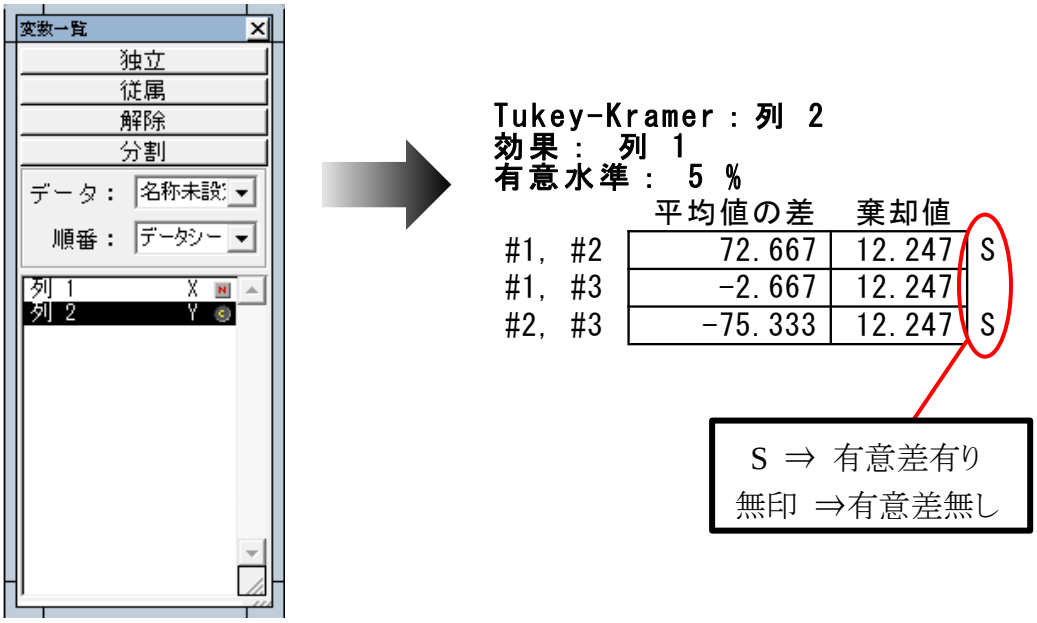
	入力列
タイプ：	文字列
ソース：	ユーザ…
クラス：	名義変…
表示形式：	・
小数点位置：	・

	列 1	列 2	入力列
タイプ：	文字列	実数	実数
ソース：	ユーザ…	ユーザ…	ユーザ…
クラス：	名義変…	連続変…	連続変…
表示形式：	・	固定小…	固定小…
小数点位置：	・	3	3
1	#1	100.000	
2	#1	87.000	
3	#1	90.000	
4	#2	20.000	
5	#2	20.000	
6	#2	19.000	
7	#3	90.000	
8	#3	95.000	
9	#3	100.000	

⑤“解析”ボタンをクリックし、新規ビューシートを選択する。

⑥左のメニュー内の分散分析の“ ▷”→Post-hoc テストの“ ▷”→Tukey-Kramer の順にクリックする。

⑦画面右に表示されている変数一覧の列 1 を独立、列 2 を従属と選択し、解析の実行を選択する。



B-1. 滅菌方法

<高圧蒸気滅菌>

高圧蒸気滅菌(オートクレーブ)は、滅菌したい器具を専用の滅菌缶や金属缶、ケースなどに入れ、滅菌テープで封印し、121℃/20 分にて行う。滅菌後は 50 度のオーブンに入れ、乾燥・保管する。

液体の高圧蒸気滅菌は専用の耐圧ビンに入れて行う。但し、液体は全体が均一な温度(121℃)になるまで時間が掛かるため、通常の器具滅菌の場合よりも 1L あたり 20 分程余分に行う。

<乾熱滅菌>

乾熱滅菌も滅菌したい器具を専用の滅菌缶や金属缶に入れて行う。ピペットの場合は吸入口に専用の綿を詰め、滅菌缶に入れて滅菌する。その他のガラス器具などは口にアルミホイルで蓋をし、そのまま滅菌する。乾熱滅菌の温度と時間は以下の通り(Table.10-7)。

Table.10-7 乾熱滅菌

一般的な滅菌	RNase free にするための滅菌
160~170℃/2~4h もしくは 180~200℃/0.5~1h	180℃/8h 以上(Over Night) もしくは 250℃/0.5h 以上

※ 乾熱滅菌は冷めるまでが滅菌なので、必ず冷めるまでまつこと。

※ 高圧蒸気滅菌と乾熱滅菌のいずれの場合も、必ず滅菌対象の材質・耐熱温度を確認すること。機器の損傷の恐れもある。

<UV 殺菌>

クリーンベンチは使用後に必ず UV 滅菌灯を点灯し、ベンチ内を殺菌した。その際、ベンチ内のプラスチック製品は全てアルミホイルで巻くこと。

<主要器具の滅菌方法>

○クリーンベンチ内器具一式

- ピンセット×1
- 50mL、100mL ビーカー×各 1
- シャーレ×2

① ブラッシングにより洗浄後、水洗いし、蒸留水で軽くリンスした。

② 滅菌缶に器具を詰め、滅菌テープで封印し121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

○チップ、Reaction Tube with Cap(PCR 専用チューブ)
専用のケース、金属缶に詰め、滅菌テープで封印し、121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。詰める作業は必ず手袋を着用して行った。

○10mL ピペット、パスツールピペット
①20 倍希釈の無リン洗剤に約 24 時間浸漬後、約 24 時間水洗いした(浸漬液は 2 ヶ月毎に交換した)。
②水気を取り、10mL ピペットは吸入口に綿栓をし、滅菌缶につめた。パスツールピペットは綿栓をせずに 3 本毎にアルミホイルで巻いて滅菌缶につめた。
③180℃で 4 時間乾熱滅菌した。

○ゲル作製用三角フラスコ、メスシリンダー
①ブラッシングにより洗浄後、水洗いし、蒸留水で軽くリンスした。
②乾燥後、口に 7cm 四方程度のアルミホイルで蓋をした。
③そのまま 180℃/Over Night にて乾熱滅菌を行った。

○50mL 遠心管、15mL 遠心管、5mL アシストチューブ
① 滅菌用バッグを遠心管あるいはアシストチューブの大きさに切る。
② 滅菌バッグに遠心管あるいはアシストチューブを入れ、機械で締める。
*両端を 3 回機械で締め、隙間が開かないよう注意する
③ 121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

B-2. Primer 表

本研究にて使用した Primer の詳細を以下(Table.10-8)に示す。

Table.10-8 Primer 表

Primer		Sequence	Cycles	Size
GAPDH	sense	5’-CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC-3’	27	322 bp
	antisense	5’-GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT-3’		
Cytokeratin-18	sense	5’-TCA GCA GAT TGA GGA GAG CA-3’	33	425 bp
	antisense	5’-TCT GAC TCA AGG TGC AGC AG-3’		
E-cadherin	sense	5’-TCC CAT CAG CTG CCC AGA AA-3’	36	500 bp
	antisense	5’-TGA CTC CTC TGT TCC TGT TA-3’		
Snail	sense	5’-TCA GAC GAG GAC AGT GGG AAA G-3’	38	487 bp
	antisense	5’-GCT TGT GGA GCA GGG ACA TTC-3’		

※Primer の作製は Invitrogen 株式会社に外注した。

B-3. RT/PCR プログラム

本研究に使用した RT 及び PCR program の詳細を以下(Table.10-9)に示す。

Table.10-9 RT program

Program	Step	Temp/Time
RT program 01	1	95.0℃/5 min
	Hold	4.0℃/∞
RT program 02	1	20.0℃/20 min
	2	42.0℃/40 min
	3	95.0℃/5 min
	Hold	4.0℃/∞

<PCR program>

Primer	Cycles	Step	Pre-PCR	PCR-cycles	Post-PCR
GAPDH	27	denature	94.0℃/5 min	94.0℃/30 sec	94.0℃/40 sec
		annealing	60.0℃/1 min	60.0℃/1 min	60.0℃/10 min
		extension	72.0℃/1 min	72.0℃/1.5 min	―
		Hold	―	―	4.0℃/∞
Cytokeratin-18	33	denature	95.0℃/3 min	94.0℃/30 sec	―
		annealing	―	60.0℃/ 1 min	―
		extension	―	72.0℃/1.5 min	72.0℃/10 min
		Hold	―	―	4.0℃/∞
E-cadherin	36	denature	95.0℃/3 min	94.0℃/1 min	―
		annealing	―	55.0℃/1min	―
		extension	―	72.0℃/1 min	72.0/ 10 min
		Hold	―	―	4.0℃/∞
Snail	38	denature	95.0℃/3 min	94.0℃/1 min	
		annealing		55.0℃/1min	
		extension		72.0℃/1 min	72.0/ 10 min
		Hold			4.0℃/∞

B-4. 本研究で使用した試薬について

<FBS の不活化・分注・保存>

① -20℃にて凍結保存されている FBS(500mL)を 37℃のウォーターバスに浸け、振り混ぜながら溶かした。
② 完全に溶かし終えたら、数回振り混ぜた。
③ 55~56℃のウォーターバスで 30 分加熱した。
④ STERICUP^{TM} にてフィルター滅菌し、30mL アシストチューブに 20~25mL ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌操作で行った。
⑤ -20℃の冷凍庫にて保存した。

※分注後初めて解凍、使用する場合は、必ず Vortex にかけること。

<ITS>

ITS(粉末状)の瓶に DEPC 処理水 50mL を入れ、攪拌、溶解させたものを分注した。

<HC>

HC の粉末 2mg を量り取り、無水 EtOH と DEPC 処理水をそれぞれ 1mL ずつ加えて溶解させたものを MILLEX®GP にて濾過、分注した。

<DEPC 処理水の作製>

① Milli-Q 水を密閉できるガラス瓶(青蓋の 500mL メディウムビン)に入れた。
② 500ml の Milli-Q 水に対し DEPC を 500μL(0.1%)加えて、蓋をきっちり閉めてよく振り混ぜた。
※DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行うこと。
③ そのまま 37℃のオーブン内に入れ、2 時間加温した。30 分に一度振り混ぜた。
※ 振り混ぜることで瓶の蓋や首の部分、液体内に DEPC が均一に広がり、全体の RNase を失活させる。
④ 瓶の蓋を十分緩めて、121℃/40 分(1 分あたり 500mL の場合)高圧蒸気滅菌にかけた。
※高圧蒸気滅菌をすることにより DEPC を除去する。滅菌後にも DEPC の臭いが残っている場合は、もう一度高圧蒸気滅菌を行う。
※DEPC は発癌性であるため、むやみに蒸気を吸わないように気を付けること。また、滅菌装置内に溜まった水は、気化して抜けた DEPC が溶け込んでいるため、その排水は責任をもって処理すること(大量の水と共に排水口へ)。

<Random Primers、各 Primer について>

これらの Stock Solution(S.S)は粉末状の試薬に DEPC 処理水を適宜加えて作成した。詳細は添付の取扱説明書に従った。

<滅菌水の作製>

① 脱イオン水を密閉できるガラス瓶(赤蓋の 1L メディウムビン)に入れた。

② 蓋をきっちり閉めた後、滅菌テープで封印し、121℃/40 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

C-1. 腹膜透析患者まとめ (#1~#97)

C-1-1. サンプルまとめ(#1-#10)

患者イニシャル・・・ A, B, C, E, H, N, O, Q, R, S,T,U,V(13人)　C,Eの患者他界

		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
採取日		2010/5/11	2010/5/18	2010/5/25	2010/6/1	2010/6/8	2010/6/22	2010/6/29	2010/6/29	2010/7/6	2010/7/27
Initial		A(1)	B(1)	C(1)	C(2)	C(3)	E(1)			A(2)	H(1)
性別		man	man	man			man			man	man
年齢		82	76	69			62			82	82
CAPD期間 (month)		39	11	24			4			41	2
透析液		①	①	①			①	②+Icodextrin	①	①	①
腹膜炎(回)		0	0	1			0			0	1
使用透析液量(ml)		1700	1500	1500			1500			1700	1700
総重量(g)		2084	1642	1483	1772	1423	1565	1110	1771	2072	1379
除水量(g)		369	129	-30	259	-90	52	-403	258	357	-336
細胞総数 (x 10^4 cells)			140	238	65	1776	94	428	57	33	133
接着細胞率											
増殖日数 (days)		24	17	10		10	16	9	9		12
Cytokeratin-18	P0										
	P1										
	P2						99%	98%	99%	94%	99%
α-SMA	P0										
	P1										
	P2						38%	2%	56%		63%
TER値(Ω・cm^2)	P0										
	P1										
	P2						14(P3)	22	16		14
タンパク抽出		×	○	○	×	○(P3)	○	○	○	未	○
増殖定数k(day^{-1})	P0										
	P1										
	P2										
	P3										
Desmin	P2		-	-		-					
Vimentin	P2		+/-	+/-		+/-					
SA-β-Gal	P0										

透析液　①Baxter ダイアニール N PD-2 1.5
②Baxter ダイアニール N PD-2 2.5
③Baxter エクストラニール

C-1-2. サンプルまとめ(#11-#20)

		#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20
採取日		2010/8/3	2010/8/17	2010/8/31	2010/9/28	2010/10/5	2010/10/19	2010/10/26	2010/11/9	2010/11/16	2010/11/30
Initial		A(3)	H(2)	C(4)	A(4)	B(2)	N(1)	A(5)	B(3)	N(2)	A(6)
性別		man	man	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢		82	82	69	82	76	49	82	76	49	82
CAPD期間 (month)		42	3	27	43	16	37	45	17	38	46
透析液		①	①	①	①	①	①	①	①	①	①
腹膜炎(回)		0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
使用透析液量(ml)		1700	1500	1500	1700	1500	2500	2000	1500	2500	2000
総重量(g)		1929	1790	1775	2412	1475	2759	2131	1603	2924	2465
除水量(g)		214	277	262	697	-38	236	113	90	401	447
細胞総数 (x 10^4 cells)		24	6039	7465	48	106	871	130	363	513	23
接着細胞率					0.76%	0.59%	0.40%	1.53%	0.58%	0.99%	5.34%
増殖日数 (days)		18	12	26	17	10	17	22	20	13	26
Cytokeratin-18	P0							100%			
	P1				96%	99%	99%	99%	99%	96%	52%
	P2	100%	99%	100%	85%	91%	98%	98%	99%		
α-SMA	P0							45%			
	P1				28%	27%	16%	9%	25%	9%	18%
	P2	70%	72%	37%	2%	22%	20%	48%	41%		9%
TER値(Ω・cm^2)	P0							不可	14		
	P1				16	22			22		
	P2	21			20	22			23		
タンパク抽出		○	○	○	○	○	○	○	○	○	未
増殖定数k(day^{-1})	P0				0.249	0.442	0.279	0.152	0.302	0.255	0.160
	P1		0.162	0.074	0.206	0.221	0.395	0.186	0.270	0.278	0.068
	P2				0.034	0.390	0.266	0.006	0.169	0.092	
	P3				0.053	0.118		不可	0.088	0.002	
Desmin	P2										
Vimentin	P2										
SA-β-Gal	P0										

増殖日数　　φ35シャーレがコンフルエントになる日数
排液密度　1.009g/ml

C-1-3. サンプルまとめ(#21-#30)

		#21	#22	#23	#24	#25	#26	#27	#28	#29	#30
採取日		2010/12/7	2010/12/14	2011/1/18	2011/1/25	2011/2/8	2011/2/15	2011/2/22	2011/3/15	2011/4/12	2011/4/19
Initial		N(3)	B(4)	A(7)	N(4)	N(5)	A(8)	B(5)	B(6)	A(9)	B(7)
性別		man	man	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢		49	76	82	49	49	82	76	76	82	76
CAPD期間 (month)		39	18	48	40	41	49	20	21	51	22
透析液		①	①	①	③	③	①	①	①	①	①
腹膜炎(回)		0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
使用透析液量(ml)		2500	1500	2000	1500	1500	2000	1500	2000	1500	1500
総重量(g)		2618	1535	2305	2983	2790	2426	1612	2601	1646	1507
除水量(g)		95	22	287	1470	1276	408	98	583	132	-6.5
細胞総数 (x 10^6 cells)		1863	105	34	1197	2137	67	139	32	397	96
接着細胞率		4.91%	2.45%	0.79%	0.54%	4.00%	1.36%	27.00%	0.97%		1.20%
増殖日数 (days)		3	9	23	6	22	28	8	30	13	21
Cytokeratin-18	P0					98%					
	P1			100%	97%		89%		100%	100%	100%
	P2	99%		100%	99%	86%		100%			99%
α-SMA	P0					9%					
	P1			54%	43%	33%	35%	9%	59%	18%	25%
	P2	68%		88%	33%	58%		0%			20%
TER値(Ω•cm²)	P0										
	P1			23	21						
	P2										
タンパク抽出		○		○(P1)	○(P1,P2)	○	○(P1)	○	○	○(P1,P2)	○(P1)
増殖定数k(day⁻¹)	P0	0.087	0.384	0.217	0.219	0.185	0.148		0.160		0.266
	P1	0.159		0.216	0.344	0.070			0.177		0.352
	P2	0.122				0.032		0.300	0.001		0.141
	P3				-0.016						
Desmin	P2										
Vimentin	P2										
SA-β-Gal	P0										

C-1-4. サンプルまとめ(#31-#40)

		#31	#32	#33	#34	#35	#36	#37	#38	#39	#40
採取日		2011/5/17		2011/5/24		2011/6/7	2011/6/14		2011/6/21	2011/6/28	2011/7/12
Initial		O(1)	O(2)	B(8)	N(6)	A(10)	H(3)	N(7)	B(9)	A(11)	N(8)
性別		woman	woman	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢		68	68	76	49	82	83	49	76	82	49
CAPD期間 (month)		20	20	23	44	53	13	45	24	53	46
透析液		①	③	①	①	①	①	①	①	①	①
腹膜炎(回)		0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
使用透析液量(ml)		1500	1500	1500	2500	1500	1500	1500	1500	1500	2500
総重量(g)		1524	1413	1617	3288	1701	1367	2464	1494	1948	2694
除水量(g)		10	-100	104	766	188	-146	950	-20	434	172
細胞総数 (x 10^6 cells)		217	126	31	2297	52	95	1605	56	8	1498
接着細胞率		0.33%			0.02%	0.59%	11.73%		8.12%	33.97%	0.07%
増殖日数 (days)		13					8	8	13	27	9
Cytokeratin-18	P0										
	P1	100%				100%	100%	100%	100%		
	P2				100%	100%	100%	100%	100%	100%	
α-SMA	P0										
	P1	30%				7%	9%	23%	9%		
	P2				27%	36%	17%	6%	3%	19%	
TER値(Ω•cm²)	P0										
	P1	27			26	19	21	19	29		
	P2	25			23	25	24	20	22	16	22
タンパク抽出											○
増殖定数k(day⁻¹)	P0	0.306			0.525	0.167	0.1439		0.151	0.059	0.396
	P1				0.254	0.22	0.4	0.439	0.367	0.181	0.33
	P2						0.1439	0.289	-0.032	0.146	0.0235
	P3						0.225	0.118	0.244	0.053	
Desmin	P2										
Vimentin	P2										
SA-β-Gal	P0					16%	9%	5%			1%

C-1-5. サンプルまとめ(#41-#50)

		#41	#42	#43	#44	#45	#46	#47	#48	#49	#50
採取日		2011/7/19	2011/8/9	2011/8/30	2011/9/13	2011/9/27	2011/10/4	2011/10/11	2011/10/25	2011/11/1	2011/11/8
Initial		H(4)	N(9)	N(10)	H(5)	B(10)	N(11)	A(12)	B(11)	N(12)	A(13)
性別		man	man	woman	man	man	man	man	man	man	man
年齢		83	49	50	83	76	50	83	77	50	83
CAPD期間 (month)		14	47	?	16	27	49	57	28	50	58
透析液		③	①	①	①	①	?	①	①	①	①
腹膜炎(回)		0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
使用透析液量(ml)		1500	2500	2500	1500	1500	?	1500	1500	2500	1500
総重量(g)		1141	2924	2768	1801	1621	2454	1760	1595	2392	1670
除水量(g)		-373	402	246	288	108	?	247	81.5	-130.5	156.5
細胞総数 (x 10^4cells)		157	1498	1923	18	159	572	17	100	1730	33
接着細胞率		3.85%									
増殖日数 (days)		12	14	15	21	13	14	16			
Cytokeratin-18	P0										
	P1	100%			100%		99%	98%	100%	100%	
	P2	99%		99%	100%		98%	100%			
α-SMA	P0										
	P1	5%			22%		13%	0%	34%	20%	
	P2	2%		44%	18%		0%	37%			
TER値(Ω・cm^2)	P0										
	P1	21	22	21	19		EVOM故障により測定不可				
	P2	19									
タンパク抽出		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
増殖定数k(day^{-1})	P0	0.248									
	P1										
	P2	0.14									
	P3	0.332									
Desmin	P2										
Vimentin	P2										
SA-β-Gal	P0	20%	47%		16%	27%	89%	57%	28%	50%	

C-1-6. サンプルまとめ(#51-#60)

		#51	#52	#53	#54	#55	#56	#57	#58	#59	#60
採取日		2011/11/22	2011/11/29	2011/11/29	2011/12/6	2011/12/20	2012/1/17	2012/1/24	2012/4/24	2012/5/8	2012/5/25
Initial		B(12)	N(13)	N(14)	A(14)	B(13)	不明	B(14)	B(15)	A(15)	Q(1)
性別		man	man	woman	man	man	不明	man	man	man	woman
年齢		77	50	50	83	77	不明	77	77	83	68
CAPD期間 (month)		29	50	50	59	30	不明	31	34	64	1
透析液		①	①	①	①	①	①	①	①	①	
腹膜炎(回)		1	1	1	1	1	不明	1	1	不明	
使用透析液量(ml)		1500	2500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	500
総重量(g)		1573	2684	2751	1748	1558	1802	1520	1572	1761	405
除水量(g)		59.5	161.5	1237.5	234.5	44.5	288.5	6.5	58.5	247.5	-99.5
細胞総数 (x 10^4cells)		44	2558	659	20	50	19	45	40	69	4221
接着細胞率									2.04%	2.79%	
増殖日数 (days)											
Cytokeratin-18	P0										
	P1	98%		100%	99%	100%			100%		78%
	P2			100%		100%				85%	
α-SMA	P0										
	P1	32%			20%	16%			38%		
	P2	18%				35%				36%	8%
TER値(Ω・cm^2)	P0										
	P1	EVOM故障により測定不可				24.3	20		18.3		
	P2										
タンパク抽出		○	×	○		○					
増殖定数k(day^{-1})	P0										
	P1										
	P2										
	P3										
Desmin	P2										
Vimentin	P2										
SA-β-Gal	P0	29%	51%	27%		69%	41%		23%	7%	2%

C-1-7. サンプルまとめ(#61-#70)

		#61	#62	#63	#64	#65	#66	#67	#68	#69	#70
採取日		2012/5/28	2012/5/29			2012/6/5			2012/6/12	2012/6/13	2012/6/19
Initial		R(1)	B(16)	Q(2)	R(2)	S(1)	Q(3)	R(3)	A(16)	R(4)	Q(4)
性別		man	man	woman	man	man	woman	man	man	man	woman
年齢		71	77	68	71	75	68	71	83	71	68
CAPD期間 (month)		1	35	1	1	36	2	2	65	2	2
透析液			①				①	①	①	①	①
腹膜炎(回)			1								
使用透析液量(ml)		500	1500	750	500	1500	1000	1500	1500	1500	1000
総重量(g)		509	1563	767	668	1395	948	1632	1759	1272	936
除水量(g)		4.5	49.5	10.25	163.5	-118.5	-61	118.5	245.5	-241.5	-73
細胞総数 (x 10^4cells)		6116	92	746	1185	251	746	187	69	491	2100
接着細胞率		0.30%	1.15%	0.65%							
増殖日数 (days)											
Cytokeratin-18	P0										
	P1	100%	89%	98%	93%		100%				
	P2	93%									
α-SMA	P0										
	P1	12%	5%	10%	13%		7%				
	P2	4%									
TER値(Ω・cm²)	P0										
	P1										
	P2										
タンパク抽出											
増殖定数k(day⁻¹)	P0										
	P1										
	P2										
	P3										
Desmin	P2										
Vimentin	P2										
SA-β-Gal	P0	10%	9%	7%	11%	8%	6%	10%			

C-1-8. サンプルまとめ(#71-#80)

		#71	#72	#73	#74	#75	#76	#77	#78	#79	#80
採取日		2012/6/19	2012/6/26		2012/7/6	2012/7/10		2012/8/7	2012/8/28	2011/9/11	
Initial		R(5)	R(6)	B(17)	T(1)	A(17)	T(2)	A(18)	B(18)	A(19)	R(7)
性別		man	man	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢		71	71	77	71	84	71	84	77	84	71
CAPD期間 (month)		2	2	36	1	66	1	67	38	68	5
透析液										①	①
腹膜炎(回)					0	0	0	0			
使用透析液量(ml)						1500	1500	1500		1500	1500
総重量(g)		1212	1538	1597	616	1826	1427	1790		1796	1484
除水量(g)						312.5	-86.5	276		282	-30
細胞総数 (x 10^4cells)		3706	2806	45						33	176
接着細胞率											
増殖日数 (days)											
Cytokeratin-18	P0										
	P1										
	P2										
α-SMA	P0										
	P1										
	P2										
TER値(Ω・cm²)	P0										
	P1										
	P2										
タンパク抽出											
増殖定数k(day⁻¹)	P0										
	P1										
	P2										
	P3										
Desmin	P2										
Vimentin	P2										
SA-β-Gal	P0										

C-1-9. サンプルまとめ(#81-#90)

		#81	#82	#83	#84	#85	#86	#87	#88	#89	#90
採取日		2011/9/18	2012/9/25	2012/10/9		2012/10/10	2012/10/30		2012/11/6	2012/11/13	
Initial		U(1)	B(19)	A(20)	U(2)	R(8)	V(1)	B(20)	B(21)	A(21)	U(3)
性別		man	man	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢		41	77	83	42	71	73	78	78	84	41
CAPD期間 (month)		1	39	69	2	5	1	40	41	70	3
透析液											
腹膜炎(回)											
使用透析液量(ml)		1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
総重量(g)		1629	1562	1752	1781	1400	1280	1350	1626	1698	1699
除水量(g)		116	49	239	268	-114	-234	-164	113	185	186
細胞総数 (x 10^4 cells)		60	79	40	55	271	78	42	639	106	73
接着細胞率											
増殖日数 (days)											
Cytokeratin-18	P0										
	P1										
	P2										
α-SMA	P0										
	P1										
	P2										
TER値(Ω・cm^2)	P0										
	P1										
	P2										
タンパク抽出											
増殖定数k(day^{-1})	P0										
	P1										
	P2										
	P3										
Desmin	P2										
Vimentin	P2										
SA-β-Gal	P0										

C-1-10. サンプルまとめ(#91-#96)

		#91	#92	#93	#94	#95	#96	#97	#98	#99	#100
採取日		2012/11/14		2012/11/27	2012/12/11	2012/12/25					
Initial		T or R	B(22)	B(23)	A(22)	B(24)	W(1)				
性別		man	man	man	man	man	man				
年齢		71	78	78	84	78	59				
CAPD期間 (month)			41	41	71	42	12				
透析液											
腹膜炎(回)											
使用透析液量(ml)		1500	1500	1500	1500	1500					
総重量(g)		1528	1636	1547	1718	1564	1902				
除水量(g)		15	122	33	205	50					
細胞総数 (x 10^4 cells)		230	209	133	83	579	245				
接着細胞率											
増殖日数 (days)											
Cytokeratin-18	P0										
	P1										
	P2										
α-SMA	P0										
	P1										
	P2										
TER値(Ω・cm^2)	P0										
	P1										
	P2										
タンパク抽出											
増殖定数k(day^{-1})	P0										
	P1										
	P2										
	P3										
Desmin	P2										
Vimentin	P2										
SA-β-Gal	P0										